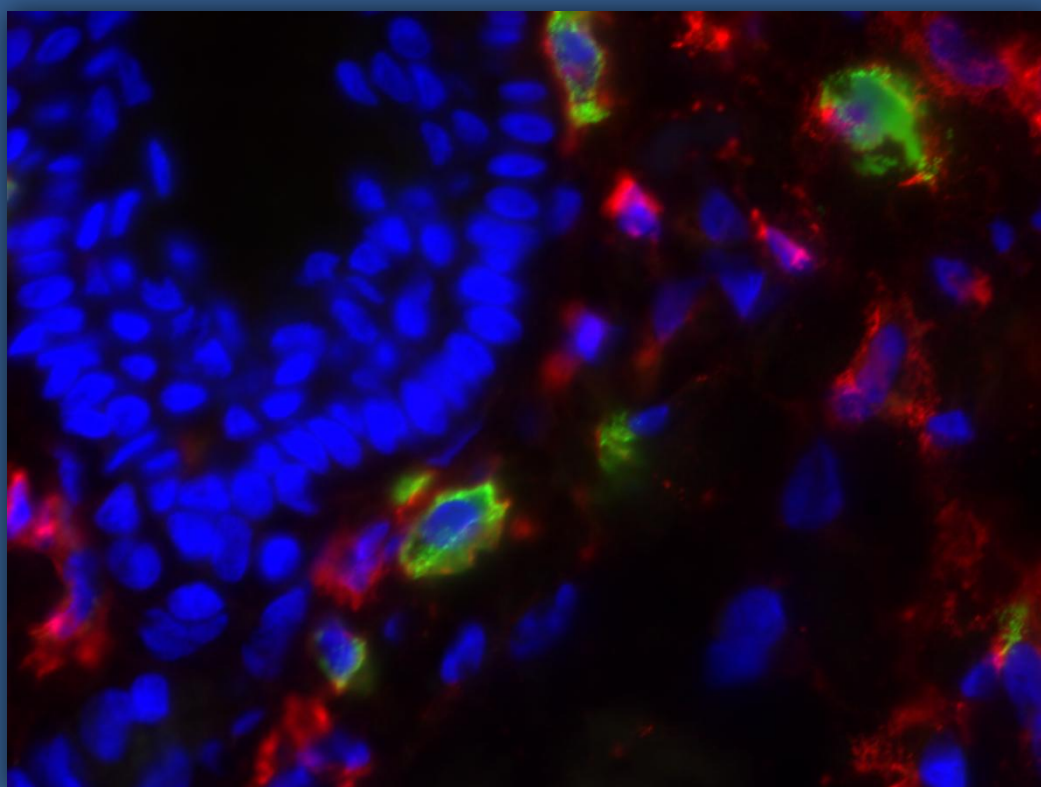


**INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL EN  
INMUNODERMATOLOGÍA:  
DE LAS MOLÉCULAS  
INMUNORREGULADORAS MODULADAS POR  
RADIACIÓN ULTRAVIOLETA AL PAPEL DE LAS  
GALECTINAS EN PACIENTES CON PSORIASIS**



**DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**TESIS DOCTORAL-TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REALIZADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE DOCTOR  
EN MEDICINA POR SILVIA PÉREZ GALA**

**MADRID, ABRIL 2014**



INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL EN INMUNODERMATOLOGÍA: DE LAS  
MOLÉCULAS INMUNORREGULADORAS MODULADAS POR RADIACIÓN  
ULTRAVIOLETA AL PAPEL DE LAS GALECTINAS EN PACIENTES CON PSORIASIS



ESTEBAN DAUDÉN TELLO, PROFESOR TITULAR DE DERMATOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y HORTENSIA DE LA FUENTE FLORES, INVESTIGADOR ASOCIADO DEL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA PRINCESA (MADRID)

INFORMAN:

Que D<sup>a</sup>. Silvia Pérez Gala ha realizado bajo nuestra dirección, durante los últimos cinco años, la Tesis Doctoral “Investigación Traslacional en Inmunodermatología: de las moléculas inmunorreguladoras moduladas por radiación ultravioleta al papel de las galectinas en pacientes con psoriasis”.

Estimamos que su trabajo es novedoso y original, además de reunir los requisitos necesarios de interés científico y rigor metodológico para ser aceptada su presentación.

Madrid, febrero de 2014

Esteban Daudén Tello

Hortensia de la Fuente Flores

*A mis hijos, Javier y María,  
mis regalos del Cielo...*



## AGRADECIMIENTOS

- ⊕ Al Profesor Amaro García Díez, por su incansable dedicación a la Dermatología y por ser mi maestro. Al Doctor y co-director de tesis Estebán Daudén, por su labor docente, su cercanía y sus palabras de aliento. A todos los adjuntos, residentes, antiguos compañeros y personal no facultativo del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario (HU) de La Princesa, por su inestimable ayuda en la presente tesis y por hacerme sentir siempre como en casa.
- ⊕ Al Profesor Francisco Sánchez Madrid, agradecerle la posibilidad y el orgullo de trabajar con él. A Hortensia de La Fuente, Investigadora y co-directora, por la que siento una profunda admiración a su dedicación, entusiasmo, paciencia y cariño. A Silvia Sánchez Cuéllar, porque me ayudó a no estar sola como clínica y a darme el último empujón. A todo el laboratorio de “Paco’s 2” y a los vecinos de “Paco’s 1”, por enseñarme cómo se trabaja en Investigación Básica.
- ⊕ A Emma Torres por su colaboración en la obtención de muestras de piel sana y a JL Jorcano por la aportación de cultivos primarios de queratinocitos (CIEMAT Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, Madrid).
- ⊕ Agradecer a todas las entidades públicas o privadas que colaboran con el desarrollo de la investigación, en particular a las que han aportado ayuda económica para la realización de este estudio: Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España, FONCICYT de EU-Mexico, INSINET, MEICA -genoma España-, Fundación Salud 2000, I.F. Cantabria y el Programa de Estimulo para la Transferencia de Resultados de la Investigación (PETRI).
- ⊕ A todos los pacientes y sujetos sanos que han participado, porque sin ellos hubiera sido imposible la elaboración de esta tesis.
- ⊕ A mi familia: mis hijos, mis padres, hermanos, tíos y a los que ya no están pero me han ayudado desde el Cielo...Por ser mis pilares, mi fuente de inspiración y darme su amor, que es lo único que considero imprescindible en mi vida. Y por último, a mis amigos, siempre dispuestos a escucharme, apoyarme y darme su cariño incondicional.



## ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>4</b>
<b>ÍNDICE.....</b>	<b>5</b>
<b>1. PRESENTACIÓN .....</b>	<b>7</b>
<b>2. RESUMEN.....</b>	<b>9</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>14</b>
3.1 CÉLULAS DENDRÍTICAS Y PIEL .....	14
3.2 PARTICIPACIÓN DE LOS QUERATINOCITOS EN LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA .....	33
3.3 EL MELANOCITO COMO CÉLULA INMUNE .....	39
3.4 RADIACIÓN ULTRAVIOLETA, PIEL Y PSORIASIS .....	44
3.5 INMUNOPATOGENIA DE LA PSORIASIS .....	55
3.6 GALECTINAS Y PIEL .....	62
<b>4. OBJETIVOS GENERALES DEL ESTUDIO.....</b>	<b>78</b>
<b>5. ESTUDIO 1: IDENTIFICACIÓN DE GENES EN RESPUESTA A RADIACIÓN ULTRAVIOLETA EN CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONOCITOS HUMANOS.....</b>	<b>79</b>
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	79
5.2 MATERIAL Y MÉTODOS .....	79
5.3 RESULTADOS.....	90
5.4 DISCUSIÓN .....	97
<b>6. ESTUDIO 2: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GALECTINAS EN CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS DE PACIENTES CON PSORIASIS .....</b>	<b>102</b>
6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	102
6.2 MATERIAL Y MÉTODOS .....	102
6.3 RESULTADOS .....	114
6.4 DISCUSIÓN .....	126
<b>7. VALORACIÓN GLOBAL .....</b>	<b>130</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>131</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>132</b>
<b>10. CLAVES DE LAS ABREVIATURAS MÁS UTILIZADAS .....</b>	<b>146</b>
<b>11. GLOSARIO DE GENES .....</b>	<b>148</b>
<b>12. ANEXOS .....</b>	<b>153</b>
ANEXO 1. PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA EL ESTUDIO DE MOLÉCULAS INMUNORREGULADORAS EN PSORIASIS .....	153
ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO .....	155

	<p>INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL EN INMUNODERMATOLOGÍA: DE LAS MOLÉCULAS INMUNORREGULADORAS MODULADAS POR RADIACIÓN ULTRAVIOLETA AL PAPEL DE LAS GALECTINAS EN PACIENTES CON PSORIASIS</p>	
---	---	---

ANEXO 3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN EN EL ESTUDIO PARA PACIENTES CON DERMATITIS ATÓPICA .....	158
ANEXO 4. PUBLICACIONES OBTENIDAS EN EL TRANCURSO DE LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS.....	159

## 1. PRESENTACIÓN

La necesidad de estrechar lazos entre la investigación básica y la clínica ha dado lugar al nacimiento de la **Investigación Traslacional**. El objetivo de ésta consiste en aplicar con eficiencia el conocimiento de los procesos celulares, moleculares, fisiológicos, químicos o genéticos a la búsqueda de tratamientos eficaces o de técnicas de prevención o diagnóstico que redunden en el beneficio de los pacientes. Para ello debe existir una incesante interacción entre el investigador básico y el clínico, con intercambio de recursos y conocimientos. Esta colaboración, en nuestro caso entre los servicios de **Inmunología** y **Dermatología** del H.U. de La Princesa, comenzó hace años con una línea de investigación centrada en el estudio de las **células dendríticas (DCs)**, de su traducción al inglés).

El **sistema inmunitario** está constituido por células y moléculas que protegen al individuo y que reaccionan de forma conjunta y coordinada frente a la entrada de sustancias ajenas o aquellas derivadas de células dañadas. Sin embargo, los mecanismos que en condiciones normales protegen a las personas de las infecciones y eliminan sustancias extrañas al organismo, en algunas circunstancias también son capaces de provocar una lesión tisular y una enfermedad. Por lo tanto, el sistema inmunológico requiere de un fino balance entre respuestas activadoras y repuestas inhibitoras para cumplir su función protectora en su justa medida sin dañar al individuo. Dentro de las células que componen el sistema inmunitario, las **células dendríticas** constituyen un pilar fundamental. Las DCs están ampliamente distribuidas por todo el organismo en lugares estratégicos de contacto con el medio externo y cumplen un importante cometido en las respuestas innatas a las infecciones y establecen conexión directa con las respuestas de la inmunidad adaptativa al actuar como células presentadoras de antígeno a los linfocitos T.

El interés científico en Inmunología estaba, en un principio, más orientado al estudio de las respuestas activadoras del sistema inmunitario; en este sentido se produjeron avances de vital importancia como el descubrimiento de las vacunas o el más reciente desarrollo de anticuerpos monoclonales frente a muchas de estas moléculas activadoras. Sin embargo, poco a poco, ha ido cobrando mayor importancia el estudio de aquellas señales y moléculas que tienen una **función inmunorreguladora** y que actúan inhibiendo la respuesta inmunológica. Una de las propiedades más destacadas del sistema inmunitario normal es su capacidad para reconocer muchos antígenos extraños, responder a ellos y eliminarlos sin reaccionar agresivamente contra las sustancias antigénicas del mismo individuo. Esta capacidad del sistema inmunológico de “insensibilidad” frente a antígenos propios se

denomina **tolerancia**. Las alteraciones que afectan a la inducción o a la conservación de esta autotolerancia originan respuestas inmunitarias frente a antígenos propios (autoantígenos) que desembocan en **enfermedades autoinmunitarias**.

Nuestro trabajo se compone de dos partes bien diferenciadas. Una primera parte, más básica, en la que el objetivo fue la búsqueda de nuevas moléculas que se expresaran en células dendríticas y que tuvieran una función inmunorreguladora. Y una segunda parte, con mayor contribución clínica, que consistió en el estudio de dichas moléculas en el contexto de una enfermedad cutánea mediada inmunológicamente. Un importante estímulo para nuestro trabajo ha sido la posibilidad de que moléculas inicialmente poco estudiadas o desconocidas, pudieran abrirnos nuevas vías de investigación o, incluso, llegar a ser potenciales dianas terapéuticas.

Por último, merece la pena mencionar de forma especial al Profesor **Ralph M. Steinman** (1943-2011) por ser uno de los tres científicos distinguidos con el **Premio Nobel de Medicina y Fisiología (2011)**, galardón obtenido “por sus descubrimientos sobre la célula dendrítica y su función en la inmunidad adaptativa” que comenzaron con la publicación: *“Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution”* en *The Journal of Experimental Medicine* en mayo de 1973.

## 2. RESUMEN

### Introducción

La piel constituye una barrera fundamental frente al ambiente externo que permite la interacción del individuo con el medio y su protección a través de un sistema inmunológico finamente regulado. De hecho, para que un organismo se mantenga en homeostasis, las respuestas activadoras e inhibidoras de la inmunidad deben mantenerse en un equilibrio perfecto. En este contexto, las DCs poseen la suficiente capacidad "organizativa" para el mantenimiento de esta balanza y constituyen además, un nexo de conexión entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Se podría considerar a esta DC como la directora de orquesta del resto de células del sistema inmunológico en la piel, motivo por el cual la tuvimos en cuenta como fundamental objeto de estudio. Sin embargo, conocemos que los queratinocitos (KCs) y melanocitos (MCs), aparte de sus funciones estructurales y de protección físico-química, también son participantes activos del sistema inmunológico de la piel, por lo que su análisis en este contexto también nos pareció muy interesante. Pusimos nuestra atención en el brazo de la balanza responsable de aquellas funciones de regulación negativa de la inmunidad ("**tolerancia inmunológica**") por ser más novedosas y resultar primordiales en el mantenimiento de la homeostasis cutánea. De esta manera, nuestro estudio comenzó con el análisis de los cambios génicos producidos por la radiación ultravioleta en DCs, KCs y MCs empleando microarrays del genoma humano completo. De entre los grupos de genes expresados diferencialmente en las DCs obtuvimos a las galectinas, lectinas altamente conservadas evolutivamente con importantes funciones inmunorreguladoras y poco estudiadas aún en enfermedades cutáneas. De esta forma, pudimos establecer nuestros objetivos (generales y secundarios), de forma secuencial, dado que el segundo estudio se derivó del primero:

### Objetivos generales

1. Identificar los genes expresados diferencialmente (tanto inducidos como inhibidos) en células dendríticas en respuesta a la radiación ultravioleta, prestando especial atención a aquellos genes potencialmente implicados en la regulación de la respuesta inmune.
2. Analizar la expresión de galectinas en células dendríticas de pacientes con psoriasis en muestras de piel (lesional y no lesional) y sangre periférica, comparando los resultados con los obtenidos en controles sanos.

## Objetivos específicos

1. Analizar los cambios en la expresión génica en células dendríticas humanas derivadas de monocitos de sangre periférica en respuesta a la radiación ultravioleta.
2. Identificar aquellos genes asociados a la regulación de la respuesta inmune que resulten modulados por la radiación ultravioleta.
3. Comparar los cambios en la expresión génica de las células dendríticas con los queratinocitos y melanocitos.
4. Estudiar la expresión de las lectinas y citocinas en la piel de pacientes con psoriasis (lesional y no lesional), así como en la piel de sujetos sanos.
5. Estudio de la expresión y localización de las galectinas en las células de Langerhans y otras células dendríticas de la piel normal.
6. Determinar la expresión de aquella(s) galectina(s) que resultara modificada en pacientes con psoriasis con respecto a sujetos sanos en subpoblaciones de células dendríticas, tanto en piel como en sangre periférica.
7. Estudios de correlación clínica.
8. Estudios funcionales de galectinas en células dendríticas.

## Material y métodos

Para la consecución del primer estudio fue necesaria la obtención de DCs derivadas de monocitos de sangre periférica de sujetos sanos, así como el aislamiento de KCs y MCs de piel sana. Tras el adecuado procesamiento, las DCs se dividieron en dos grupos (radiadas con UVA+UVB/ no radiadas), se extrajo el ARN y se hibridó en los bioarrays del genoma humano completo (55.000 genes). Por otra parte, los KCs y MCs también fueron tratados bajo las mismas condiciones experimentales (radiados/ no radiados) para compararlos con las DCs en la expresión de determinados genes inmunorreguladores empleando las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR) y western blot (WB). Los datos obtenidos se analizaron por la prueba de ANOVA para determinar las diferencias entre más de 2 grupos.

En el segundo estudio, se obtuvieron muestras de piel (lesional y no lesional) y sangre periférica de 24 pacientes con psoriasis, así como piel y sangre periférica de 10 sujetos sanos y sangre periférica de 6 pacientes con dermatitis atópica. Las biopsias fueron utilizadas en las técnicas de RT-PCR y WB (lisados) y se tomaron cortes para tinciones de inmunofluorescencia. Para estudiar las galectinas por citometría de flujo se aislaron DCs *ex vivo* sólo de pacientes sanos. Por otro lado, parte de las muestras se emplearon para la extracción del ARN y realizar RT-PCR para lectinas y citocinas implicadas en la activación (IL-17) e inhibición (IL-10) de la respuesta inmunológica, con posteriores estudios de correlación con la expresión de gal-1. Por último, se determinó la expresión de gal-1 en lisados de piel total por WB. La sangre periférica de sujetos sanos se empleó en primer lugar para el estudio de la expresión de galectinas-1,-3 y -9 así como de ICOS e ICOSL en las distintas subpoblaciones de DCs circulantes (DCs mieloides-mDCs- y DCs plasmacitoides-pDCs-). Posteriormente se estudiaron las moléculas anteriores sólo en las mDCs para comparar su expresión en sujetos sanos y pacientes con psoriasis, también mediante citometría de flujo. Tras encontrar que la gal-1 era la molécula con mayores diferencias significativas, fue la elegida para comparar su expresión entre la población sana y los pacientes con psoriasis y dermatitis atópica, correlacionarla con el PASI en la población psoriásica y concluir con los estudios funcionales.

## Resultados

El análisis estadístico de los valores en la **expresión génica de DCs irradiadas comparadas con no-irradiadas**, puso de manifiesto la modulación de **64 genes** con una  **$p < 0.05$** . Entre estos 64 genes, **40 estaban inducidos** a más del doble del valor basal tras la exposición a UVA+UVB. De manera análoga, había **24 genes** cuya expresión estaba **reducida** a la mitad tras la radiación UVA+UVB. Los genes fueron estratificados en grupos funcionales (definidos por su implicación en metabolismo, apoptosis, diferenciación celular...) empleando bases de datos disponibles para ello. Para corroborar estos resultados de los microarray **se seleccionaron 24 de los genes** modulados en DCs para analizarlos por ensayos de **RT-PCR con sondas Taq-Man comparados con KCs y MCs**. Los genes seleccionados se eligieron fundamentalmente por sus potenciales funciones inmunorreguladoras. La mayor concentración de resultados de genes regulados específicamente por tipo celular fue la observada entre los genes inmunorreguladores. La exposición a UVA+UVB provocó una **disminución de la expresión de Gal-1 y Gal-3 en**



**DCs humanas en contraste con los MCs** que presentaron un importante incremento en la expresión de ambas.

En cuanto a los resultados del segundo estudio, en las muestras cutáneas obtuvimos que la expresión de **gal-1 era defectuosa en la piel psoriásica, tanto en piel lesional como en piel aparentemente sana**; además, paralelamente, los niveles de IL-10 también estaban disminuidos en estas muestras. Por otra parte, logramos demostrar la expresión de gal-1,-3 y -9 en las células de Langerhans (LCs, de su traducción al inglés) de sujetos sanos, notándose comparativamente una **disminución del gal-1 también en las LCs de pacientes con psoriasis**. En sangre periférica, las gal estaban expresadas diferencialmente en los dos subtipos de DCs circulantes (mDCs y pDCs) y la expresión de **gal-1 era, una vez más, defectuosa en las DCs de sangre periférica de pacientes con psoriasis**. El análisis de correlación entre la **actividad de la enfermedad (PASI)** y la expresión de gal-1 en mDCs de sangre periférica mostró que **los índices de actividad más elevados se asociaban con niveles más bajos de gal-1**. Por último, en los estudios funcionales, se demostró que la inhibición de la unión de galectinas incrementaba la producción de IFN- $\gamma$  y reducía la producción de IL-10 por los linfocitos TCD4+.

## Conclusiones

1. Hay varios genes expresados diferencialmente en las células dendríticas en respuesta a la radiación ultravioleta que intervienen en la regulación de la respuesta inmune: el ligando coestimulador inducible (ICOSL), IL1, trombospondina-1 (THBS1), IL10, GADD45A, GADD45B, Galectina 1, Galectina 3, SLA, CXCR4, SOCS1, PTPE, CCR7, e IL12A.
2. La radiación ultravioleta induce varios genes implicados en daño al ADN y respuesta al estrés en células dendríticas, queratinocitos y melanocitos: FDXR, PCNA, PLK2 y GADD45A.
3. La radiación ultravioleta provoca una disminución de la expresión de Gal-1 y Gal-3 en células dendríticas humanas en contraste con los melanocitos que presentan un importante incremento en la expresión de ambas.
4. A nivel de proteína, la exposición de las células dendríticas humanas a la radiación ultravioleta muestra una clara disminución de la expresión de Gal1, Gal3, SLA, PTPE,



	<p>INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL EN INMUNODERMATOLOGÍA: DE LAS MOLÉCULAS INMUNORREGULADORAS MODULADAS POR RADIACIÓN ULTRAVIOLETA AL PAPEL DE LAS GALECTINAS EN PACIENTES CON PSORIASIS</p>	
---	---	---

**ICOSL y SOCS1 y una inducción de GADD45a y THBS1 comparadas con células dendríticas no radiadas.**

**5. Los pacientes con psoriasis tienen una baja expresión de gal-1 en las células dendríticas mieloides de sangre periférica y en las células de Langerhans de piel lesional y no lesional, lo que indica una función importante de la gal-1 en la inmunopatogenia de la psoriasis.**

**6. El análisis de correlación entre el PASI y la expresión de gal-1 en células dendríticas mieloides muestra que los índices de actividad más elevados se asocian con niveles más bajos de gal-1.**

**7. La inhibición de la unión de gal-1 incrementa la producción de IFN- $\gamma$  disminuye la producción de IL-10 por los linfocitos TCD4+. Por lo tanto, los defectos en la expresión de gal-1 por las células dendríticas puede promover la respuesta inmune Th1 y Th17, probablemente mediante el control de esta expresión de IL-10.**

### 3. INTRODUCCIÓN

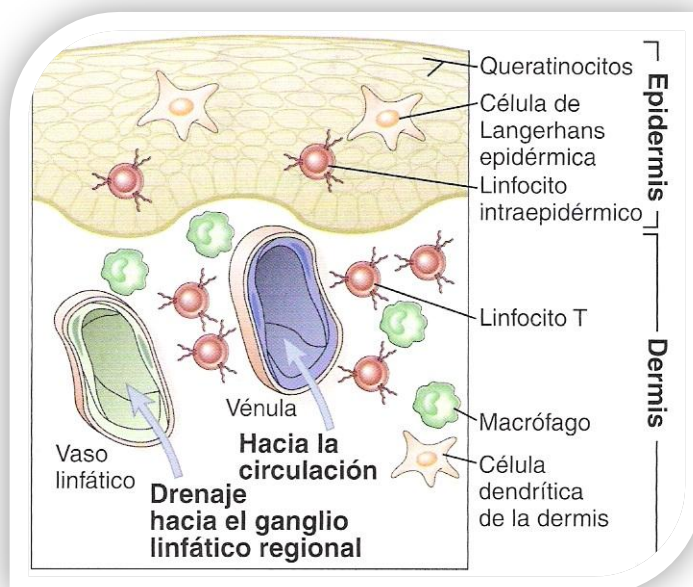
#### 3.1 CÉLULAS DENDRÍTICAS Y PIEL

La piel desempeña una función fundamental en la protección del individuo frente al ambiente exterior. Lejos de ser una mera barrera mecánica, la piel constituye una estructura dinámica y compleja integrada por células, tejidos y elementos de la matriz extracelular con múltiples funciones. Si nos centramos en la actividad **inmunológica de la piel**, ésta representa la primera barrera frente al medio externo y está equipada de un complejo entramado de células con función inmunitaria. Inicialmente éste se denominó **“tejido linfoide asociado a la piel”** (SALT, de su traducción al inglés) [1] y posteriormente **“sistema inmunitario cutáneo”** [2] (Fig. 1). Este sistema inmunológico engloba, entre otros componentes, al **sistema mononuclear fagocítico de la piel**, que a su vez está compuesto por macrófagos, células de Langerhans y células dendríticas dérmicas [3].

Cuando hablamos de reacción inmunológica en la piel, hemos de tener en cuenta que encontraremos distinta celularidad y actividad del sistema inmunitario cutáneo si consideramos la **piel normal** (o en estado quiescente) o si ésta se encuentra **“inflamada”**. Considerando los tipos celulares que intervienen en el sistema inmunitario cutáneo en la **piel normal**, distinguiremos a las principales poblaciones celulares según su localización (Fig.1):

En la **epidermis** encontramos a los queratinocitos, células de Langerhans y los linfocitos T (LT) intraepidérmicos. Los **queratinocitos** producen varias citocinas que pueden estar involucradas en las reacciones de la inmunidad innata y en la inflamación cutánea. Las **LCs**, situadas en la porción suprabasal de la epidermis, son las células dendríticas epidérmicas del sistema inmunitario cutáneo. Los **linfocitos intraepidérmicos** tan sólo suponen alrededor del **2%** de los linfocitos asociados a la piel (el resto reside en la dermis), y la mayoría son linfocitos T CD8+.

La **dermis**, compuesta principalmente por tejido conjuntivo, contiene **linfocitos T (CD4+ y CD8+)** residentes en los que predomina su localización perivascular y suponen, en número, el doble de los linfocitos T presentes en la sangre circulante [4], además de **macrófagos** dispersos. Por otra parte, también encontramos otras DCs denominadas células **dendríticas dérmicas** (dDCs, de su traducción al inglés).



**Figura 1: Componentes celulares del sistema inmunitario cutáneo.** Los principales componentes del sistema inmunitario cutáneo recogidos en este dibujo esquemático abarcan los queratinocitos, las células de Langerhans y los linfocitos intraepidérmicos, todos situados en la epidermis; así como los linfocitos T, las células dendríticas dérmicas y los macrófagos, localizados en la dermis. *Extraído de Abbas et al: Cellular and Molecular Immunology 6e (Elsevier 2008).*

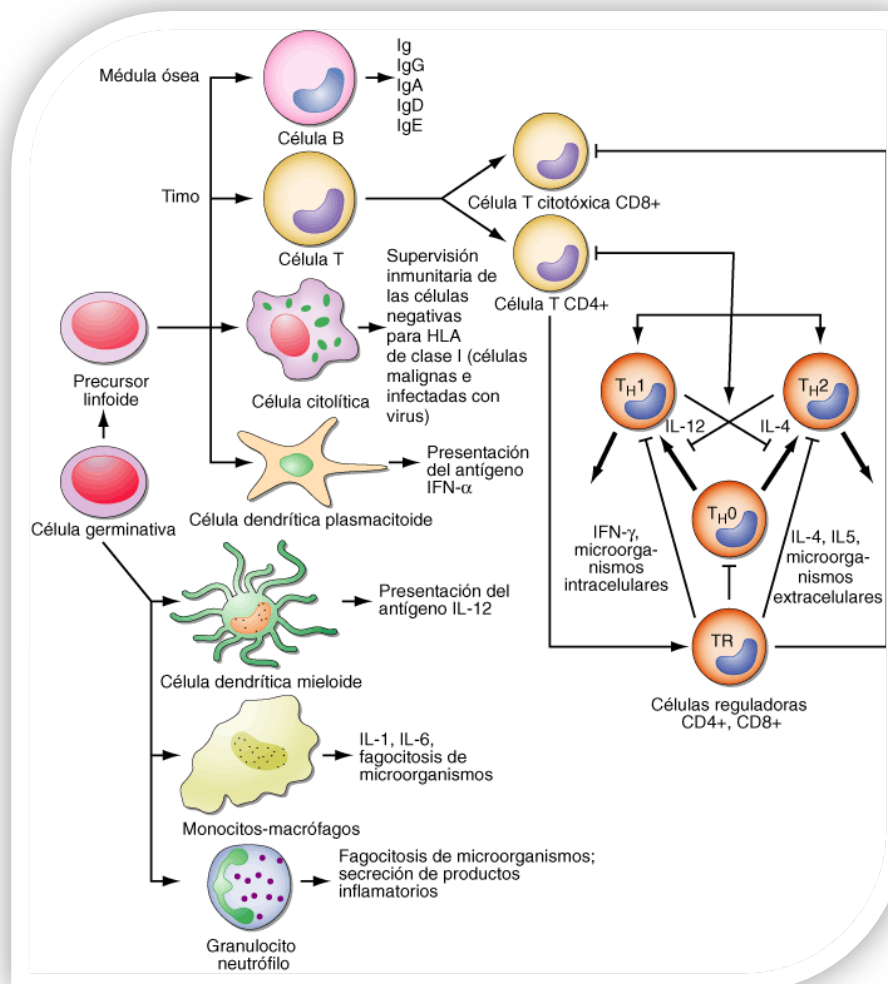
En el supuesto de que la piel reciba una agresión externa (física, química, microbiana...), se pondrán en marcha los mecanismos de la **inmunidad innata y adaptativa** (Tabla 1) que, responderán de forma complementaria y eficaz ante las distintas amenazas. Sin embargo, el **balance entre respuestas activadoras e inhibitoras que mantienen el estado de quiescencia**, también se puede inclinar hacia la inflamación si el organismo reacciona de forma exagerada (propiciando una **pérdida de la tolerancia inmunológica**).

**Tabla 1 Características y componentes responsables de la inmunidad innata o adaptativa.**

	INMUNIDAD INNATA	INMUNIDAD ADAPTATIVA
CARACTERÍSTICAS	INMEDIATA INESPECÍFICA CORTA NO MEMORIA	TARDÍA ESPECÍFICA DURADERA MEMORIA
CÉLULAS Y MECANISMOS EFECTORES	BARRERA CUTÁNEA FACTORES SOLUBLES MONOCITOS/MACRÓFAGOS PNM NEUTRÓFILOS CÉLULAS NK CÉLULAS DENDRÍTICAS	CÉLULAS DENDRÍTICAS LINFOCITOS T LINFOCITOS B

Nos centraremos en el estudio de las células dendríticas, aportando unas ideas generales sobre este tipo celular y, posteriormente, analizaremos los subtipos específicos de DCs que encontramos en la piel, tanto normal como inflamada.

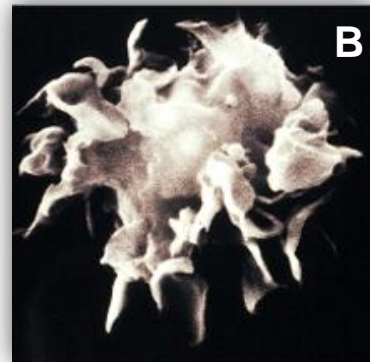
Las **células dendríticas**, del griego *dendron* (árbol), son células inmunitarias accesorias derivadas de células precursoras de la médula ósea (CD34+), que pertenecen en su mayoría a la estirpe de los **monocitos** y expresan niveles elevados de moléculas de **clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH)** (Fig.2).



**Figura 2: Modelo esquemático de las células del sistema inmunitario.** Se indican las células precursoras así como las principales citoquinas producidas por cada tipo celular y las interacciones entre las distintas subpoblaciones de linfocitos T. Las flechas indican que las células se desarrollan a partir de células precursoras o producen citocinas o anticuerpos; las líneas

perpendiculares señalan las interacciones intercelulares. *Extraído de: Harrison. Principios de Medicina Interna (17ª edición). Mc Graw Hill (2008).*

Desde el punto de vista estructural se caracterizan por sus delgadas y largas **prolongaciones citoplásmicas** que sirven para ampliar su superficie de contacto, procediendo a la recogida activa de los componentes del medio tisular extracelular y a su interiorización (Figs.3A y B).



**Figura 3: Células dendríticas.** A. Microfotografía óptica de células dendríticas cultivadas derivadas de precursores de la médula ósea. B. Microfotografía electrónica de barrido de una célula dendrítica que muestra las extensas prolongaciones de la membrana. *Extraído de Abbas et al: Celular and Molecular Immunology 6e (Elsevier 2008).*

Además, las DCs expresan diversos **receptores de superficie** como los receptores **Toll-like** (TLR, de su traducción al inglés) [5] y las **lectinas de tipo C** [6] que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos y transmiten señales activadoras a la célula. En la sangre periférica se han descrito dos subpoblaciones de DCs bien estudiadas: las **DCs mieloides o convencionales** que se caracterizan por la expresión de **CD11c** y las **DCs plasmacitoides**, que muestran positividad para **CD123** [7].

La descripción inicial de las DCs surgió de la convergencia de los estudios anteriores de **Paul Langerhans** (LCs) con una línea de investigación diferente que comenzó en **1973 por Steinman y Cohn**, los cuales emplearon por primera vez el término de “células dendríticas” para describir a unas células con largas prolongaciones aisladas en el bazo y posteriormente en los ganglios linfáticos de ratón [2]. El estudio de las DCs cobró un interés creciente debido al hallazgo de que este tipo celular era el más eficaz en el proceso de activación de los linfocitos T naïve (los que no han tenido contacto anteriormente con un determinado antígeno), hacia linfocitos T efectoras. Más adelante, se comprobó que las LCs también eran capaces de estimular de manera eficiente a linfocitos T naïve, estableciendo así la hipótesis de la relación existente entre las DCs y las LCs [8]. El hallazgo de las LCs

epidérmicas migrando vía linfática hacia los ganglios linfáticos subcutáneos, donde aparecían como DCs, corroboró dicha relación [9].

Puede afirmarse que los trabajos iniciales de Steinman y otros muchos autores posteriores, han permitido la emergencia de toda una serie de estudios acerca de la biología de las células dendríticas y de sus distintas funciones inmunitarias. En la Fig.4 podemos observar cómo el interés científico por las células dendríticas ha ido en aumento de forma exponencial durante las últimas décadas [10].

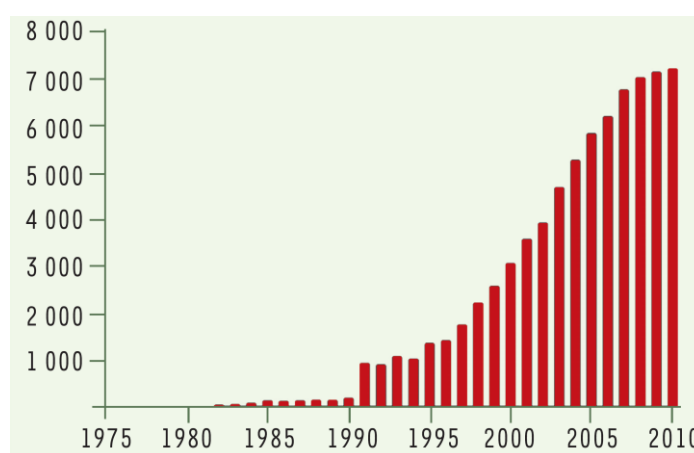
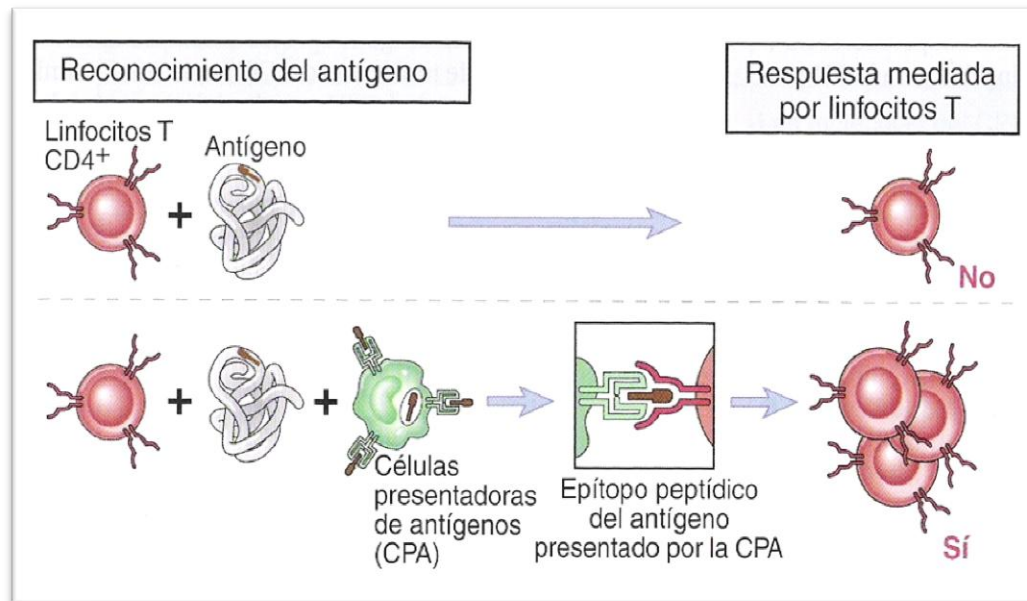


Figura 4: Evolución del número de publicaciones relacionadas con las células dendríticas en las últimas décadas (PubMed).  
Extraído de [10].

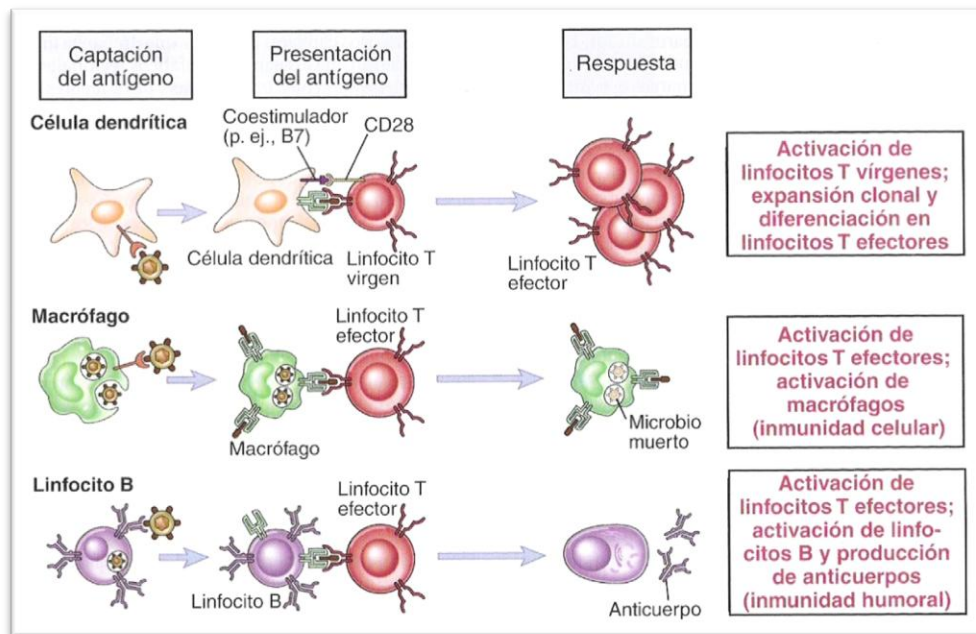
Funcionalmente, las DCs actúan como **células presentadoras de antígeno** (CPA) altamente especializadas. Las CPA son necesarias porque los antígenos proteicos por sí mismos no tienen capacidad para desencadenar la activación de los linfocitos T y son las CPAs las encargadas de procesarlos (Fig.5) y presentarlos a los linfocitos T. Los péptidos antigénicos son presentados a los linfocitos T mediante su asociación con las moléculas de superficie del CMH. Cualquier célula nucleada expresa moléculas de **clase I del CMH** y puede actuar como **CPA no profesional**. De esta manera, si una célula del organismo está infectada, puede ser reconocida y eliminada. Por su parte, las **CPAs profesionales** son aquellas que expresan moléculas de **clase II del CMH** de forma constitutiva y poseen mecanismos específicos para la captura y presentación antigénica. Entre estas **CPAs profesionales** podemos encontrar a las **DCs**, los **macrófagos** y los **linfocitos B** (LB) (Fig.6), siendo las células dendríticas las más eficaces para activar a los linfocitos T CD4+ y CD8+ *vírgenes o naïve*. Las DCs están distribuidas como una amplia red por numerosos órganos, entre los que se encuentran las barreras epiteliales, donde están presentes como “vigilantes” para **capturar los antígenos** extraños y transportarlos hacia los órganos



linfáticos periféricos. A lo largo de los años se ha visto que este entramado de DCs no está constituido por un solo tipo celular, sino que se compone de varios subtipos de DCs íntimamente relacionadas pero con diferentes líneas de desarrollo y funciones [11].



**Figura 5: Las CPAs son necesarias para la activación de los linfocitos T.** Los LT CD4+ no responden a un antígeno proteínico por sí mismos, pero sí lo hacen en presencia de una CPA. La función de las CPA consiste en presentar un péptido derivado del antígeno al linfocito T. Las CPA también expresan coestimuladores que son importantes para la estimulación de los linfocitos T. *Extraído de Abbas et al: Celular and Molecular Immunology 6e (Elsevier 2008).*



**Figura 6: Funciones de las diferentes células presentadoras de antígeno.** Los tres tipos principales de CPAs para los linfocitos T CD4<sup>+</sup> actúan presentando antígenos en diferentes etapas y en diferentes tipos de respuestas inmunitarias. *Extraído de Abbas et al: Cellular and Molecular Immunology 6e (Elsevier 2008).*

Las DCs sufren un proceso de **maduración** que es inducido tras la detección de gérmenes patógenos, exposición a citocinas proinflamatorias o tras la señalización a través de receptores de superficie (CD40). Una vez estimuladas, las DCs sufren importantes cambios fenotípicos: cobran movilidad y cambian su patrón de expresión de receptores de superficie (p.e. sobreexpresión de **CCR7**), lo que les permite migrar hacia los tejidos linfáticos regionales. Además, las DCs activadas aumentan la expresión de moléculas del **CMH**, moléculas **coestimuladoras** (que funcionan conjuntamente con los antígenos en la estimulación de los linfocitos T) y, secretan **citocinas y quimiocinas** que inician o modifican muchas de las respuestas de los LT [12]. Las DCs tienen una **función** fundamental en el desarrollo de la respuesta efectora antígeno-específica de las poblaciones de **linfocitos T-helper tipo 1** (Th1), **Th2** o en los recientemente identificados linfocitos **Th17** y **Th22** ([13];[14];[15]), así como en la inducción de los linfocitos T reguladores (LTregs). Otra característica funcional de las DCs es la capacidad de presentar antígenos exógenos a las **células T CD8<sup>+</sup> a través del MHC de clase I**, proceso que se denomina “**presentación cruzada**” y así promover potentes respuestas citotóxicas de LT, mecanismo también descrito en las LCs [16].



Por otra parte, cabe destacar, que muchas DCs presentes en tejidos o en órganos linfoides, parecen estar en un **estado funcional inmaduro**, es decir, que son capaces de captar antígenos pero incapaces de iniciar la inmunidad mediada por LT. Lejos de ser meras células “espectadoras”, estas DCs son muy importantes para presentar autoantígenos a los linfocitos T reguladores, y de esta forma son también importantes mediadoras de la **tolerancia inmune periférica**, contribuyendo así al mantenimiento de la homeostasis inmune [17]. De esta forma, la captación de antígenos por las DCs en la piel, mucosas e incluso en neoplasias, puede inducir una tolerancia específica a un antígeno en lugar de la activación de los LT efectores. En estas condiciones, no hay un aumento de expresión de moléculas coestimuladoras y se produce **IL-10** en lugar de **IL-12** (Fig.7). Este mecanismo podría aportar un importante medio para evitar la autoinmunidad pero también permitiría actuar como **vía de escape** por la cual los **antígenos asociados a neoplasias podrían inducir tolerancia en lugar de inmunidad**.

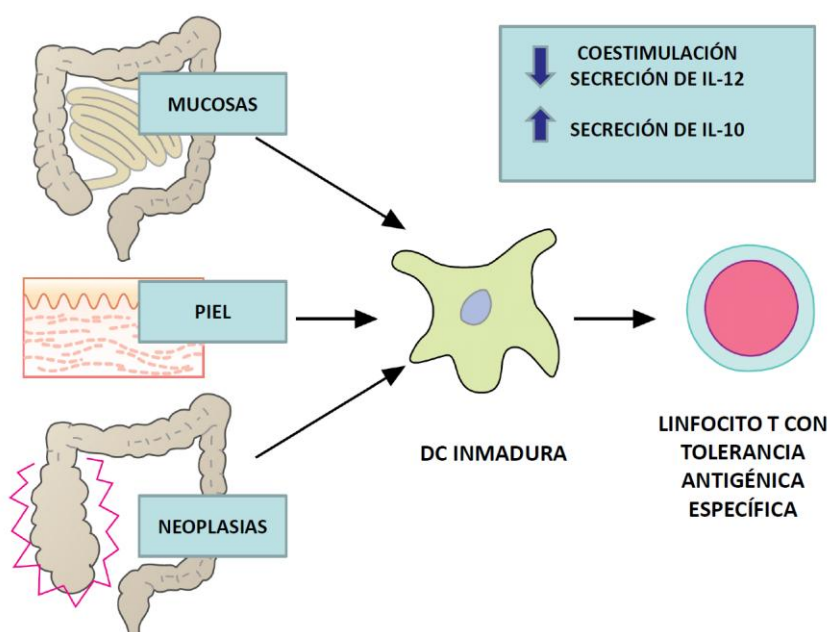
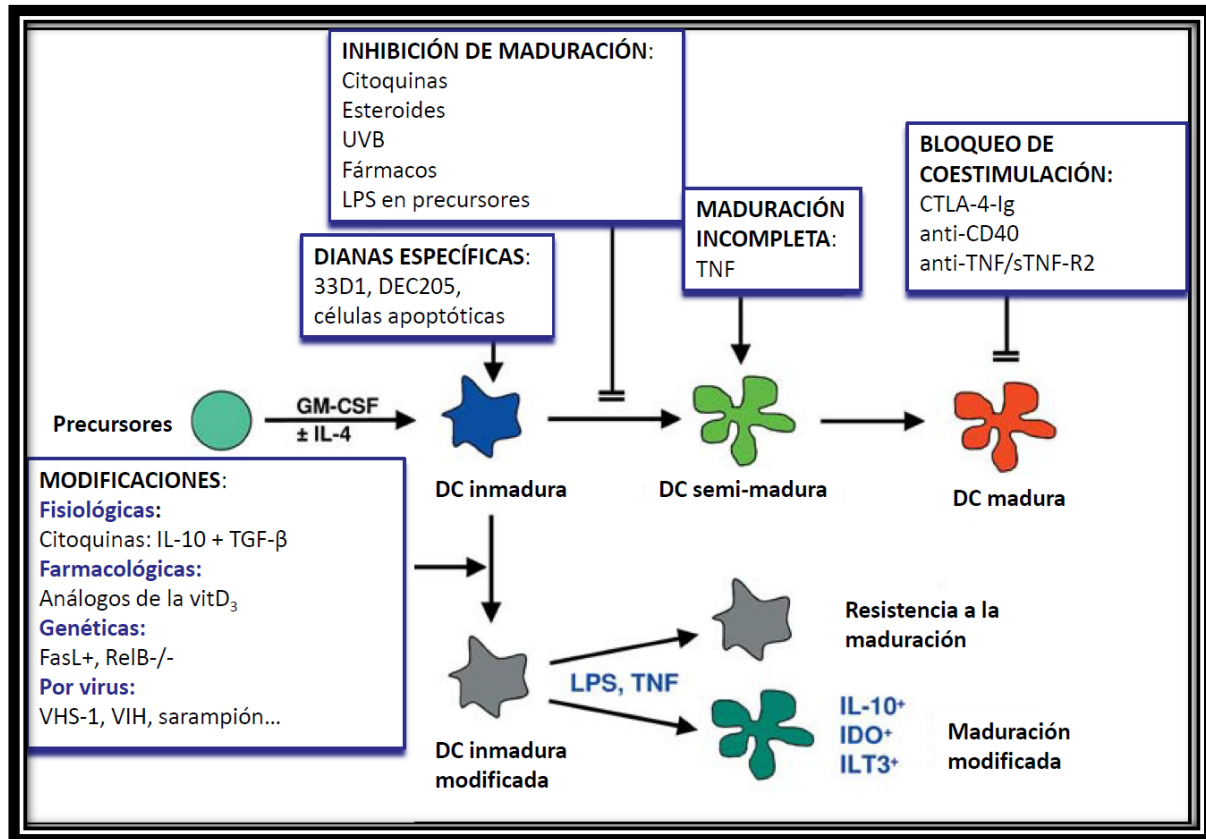


Figura 7: Potencial tolerogénico de las células dendríticas inmaduras. Modificado de Burmester et al: Color Atlas of Immunology (Thieme 2003).


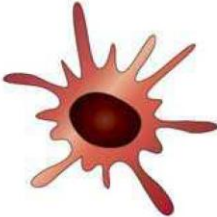
Actualmente se considera que el paradigma **DC madura=proinflamatoria** y **DC inmadura= tolerogénica** supone una visión muy simplista [18], puesto que se ha comprobado una enorme plasticidad en los distintos subtipos de DCs (Tabla 2). En este sentido, la tolerogenicidad de las DCs no parece ser una propiedad específica de un subgrupo de DCs ni estar restringida al estado inmaduro de las DCs. La evidencia in vivo sugiere que las DCs pueden inducir una **“tolerancia supresora”**, fundamentalmente

mediante la **captura continuada y presentación de antígenos** asociados a células o proteínas del ambiente bajo condiciones de **quiescencia** [19] [4]. En humanos aún se conoce muy poco acerca de esta función inmunorreguladora de las DCs in vivo. En este sentido, parece que las DCs inmaduras inducen a **LTregs productores de IL-10** que suprimen la función de otros LT efectores de forma parcialmente dependiente de IL-10 ([20];[21]). Otros factores inductores de tolerancia en las DCs son la **resistencia a los factores inductores de la maduración**, el **receptor ILT3 (Immunoglobulin-Like Transcript 3)** [22] o la activación de enzimas como la **indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO)** [17] o **A20** [23] (Fig.8). Se ha demostrado en **ratones deficientes en ILT3 en DCs** que se incrementa la respuesta de los **TLRs** a sus ligandos específicos, lo cual se refleja en una síntesis y secreción incrementada de citocinas proinflamatorias como **IL-1- $\alpha$ , IL-1- $\beta$ , IL-6 e IFN de tipo I**. Las DCs deficientes en ILT3, también secretan más quimiocinas **CXCL10 y CXCL11** en respuesta a la activación de los TLRs, lo cual se traduce en una migración acelerada de LT [24]. En cuanto a la enzima **IDO**, se ha demostrado que la activación del receptor **CD200** en las DCs plasmacitoides induce su liberación, iniciando el **catabolismo del triptófano** que altera las funciones de los LT [25]. Por último, la enzima **A20 (o TNFAIP3, Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3)** es una potente molécula de señalización antiinflamatoria que regula múltiples cascadas del sistema inmune innato dependientes de ubiquitina. A20 es inducida por señales dependientes de la vía **NF- $\kappa$ B** (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, también denominado p50) y a su vez, restringe la duración y la intensidad de la señalización por varias moléculas implicadas en esta vía. Así pues, la inducción de la expresión de A20 constituye un bucle de reentrada negativo para la señalización NF- $\kappa$ B [26].



**Figura 8: Métodos para la generación in vitro o la selección in vivo de DCs tolerogénicas.** Muchos métodos para la obtención de DCs tolerogénicas están centrados en las DCs inmaduras. Éstas se pueden seleccionar específicamente in vivo mediante la liberación de material apoptótico o mediante la unión a receptores de superficie específicos. La maduración espontánea de las DCs generadas in vitro se puede conseguir añadiendo inhibidores de la maduración. La inhibición de la maduración in vivo se obtiene mediante la inhibición de la coestimulación en las DCs casi maduras (DCs semi-maduras). Las DCs con maduración incompleta (DCs semi-maduras) todavía tienen la capacidad de ser tolerogénicas. Debido al problema del mantenimiento de las DCs inmaduras de una manera estable, el objetivo es que las modificaciones de las DCs resulten en DCs inmaduras resistentes a la maduración o en DCs modificadas a través de la activación de receptores de superficie inhibidores (IDO, ILT-3) o la liberación de citoquinas inhibitoras (IL-10). Modificado de de Lutz MB et al. Handbook of Dendritic Cells. Biology, diseases and therapies (Wiley 2006).

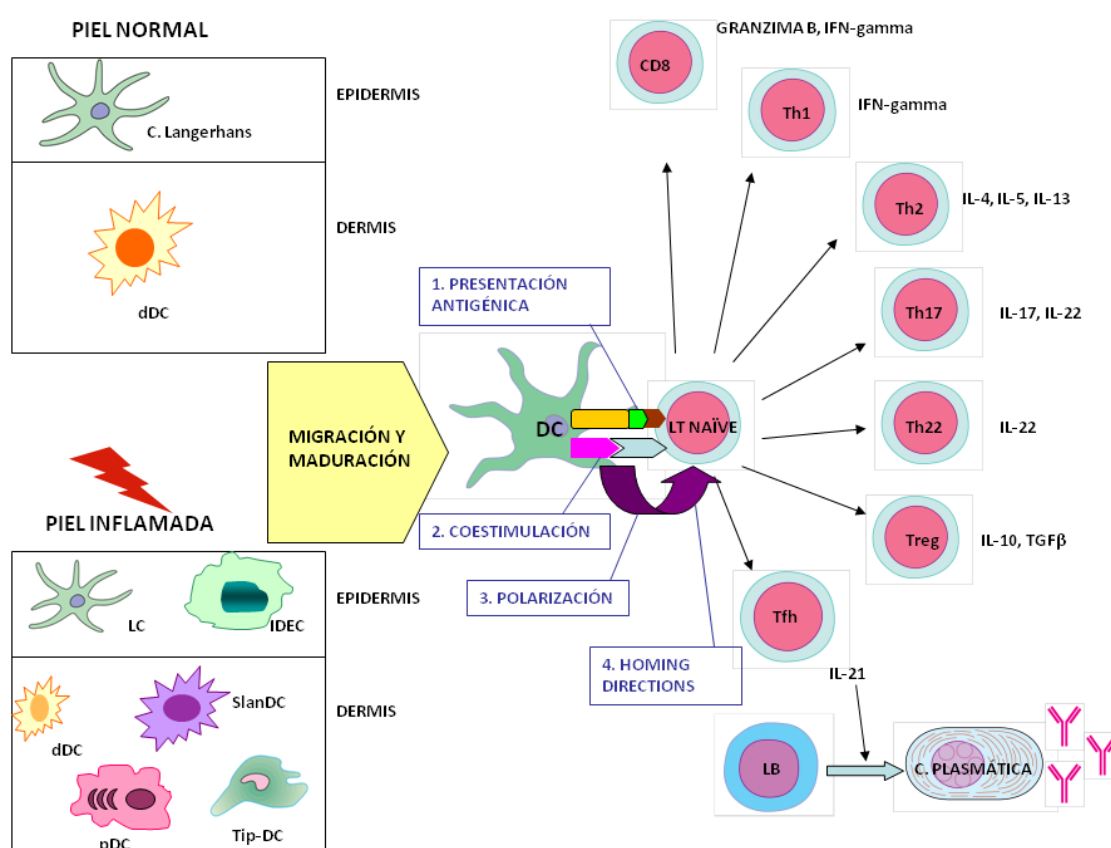
Tabla 2: Diferencias en las capacidades funcionales de las DCs inmaduras y maduras

	DC inmadura	DC madura
		
Ubicación	Tejidos periféricos	Organos linfáticos secundarios
Capacidad endocítica	++	+/-
Capacidad de procesamiento	++	+/-
Expresión de moléculas coestimuladoras y de presentación	+	++
Capacidad estimuladora de linfocitos T vírgenes	+/-	++

Por tanto, las DCs se sitúan como conexión entre la inmunidad innata y adaptativa, cumpliendo un papel esencial tanto en la respuesta inflamatoria como en la tolerancia inmunológica. Cabe destacar, como ya es conocido dentro del campo de la investigación traslacional, que debido a su eficacia en la presentación de antígenos y estimulación linfocitaria, las **DCs constituyen vehículos fundamentales para la terapia anti-neoplásica y el desarrollo de vacunas contra estos tumores**. Las DCs se cargan con antígenos específicos de neoplasias malignas, que posteriormente estimularán la respuesta inmunitaria del huésped para desencadenar una respuesta específica contra el antígeno y, en consecuencia contra dicha neoplasia.

En los últimos años se han producido grandes avances en la caracterización de las células dendríticas residentes en la piel y sus funciones, en gran parte debido a la contribución de modelos animales (principalmente murinos) modificados genéticamente [27] [6]. Sin embargo, aunque estos hallazgos nos hayan permitido aumentar nuestro conocimiento y comprensión de la red de DCs cutáneas con datos de gran valor, encontramos dificultades al establecer paralelismos entre las DCs del humano y el ratón. Estas **discrepancias entre los modelos murinos y la piel humana** se basan en la heterogeneidad de las DCs, la variabilidad entre los donantes, la diversidad de marcadores para la identificación de los distintos subtipos de células dendríticas y los distintos acercamientos experimentales. Recientemente, distintos autores [28-30] han intentado

resumir los conocimientos hasta el momento acerca de los distintos **subtipos de células dendríticas cutáneas en piel humana** y sus características fenotípicas. En este contexto (ver Fig.9), encontramos que en la epidermis, en “estado quiescente” (sin estímulo) se encuentran las **células de Langerhans (LCs)** y en la dermis las **células dendríticas dérmicas (dDCs)**. Tras un estímulo inflamatorio o de daño podemos encontrar en la epidermis, aparte de las LCs, las denominadas **células dendríticas epidérmicas inflamatorias (IDECs)**, cuyos marcadores son: **CD1a<sup>low</sup>, langerina-, CD11b+ y CD36+** [31]. Mientras que en la dermis, en este estado activado, encontramos además de las dDCs a las **células dendríticas plasmacitoides (pDCs)**, las **células dendríticas que expresan 6-sulfo LacNac (SlanDCs)** y las **células dendríticas productoras de TNF $\alpha$  y sintasa inducible del óxido nítrico (Tip-DCs)**.



**Figura 9: Células dendríticas en la piel y su control sobre la respuesta inmune adaptativa.** A la izquierda: diferentes subtipos de células dendríticas en la piel normal (quiescente o en homeostasis) e inflamada. En el centro: presentación antigénica de la DC madura al linfocito T naïve en el ganglio linfático. Los cuadros azules muestran las señales necesarias para el desarrollo de la respuesta T efectora más adecuada en cada situación (a la derecha). DC: célula dendrítica; dDC: célula dendrítica dérmica; IDEC: célula dendrítica epidérmica inflamatoria; pDC: célula dendrítica plasmacitoide; SlanDC: célula

dendrítica que expresa 6-sulfo LacNac; Tfh: linfocito T helper folicular; Th: linfocito T helper; Tip-DC: célula dendrítica productora de TNF $\alpha$  y sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS); Treg: linfocito T regulador. *Modificado de [28].*

### 3.1.1 Piel normal

#### *EPIDERMIS: CÉLULAS DE LANGERHANS*

Las **células de Langerhans** son las DCs presentadoras y procesadoras de antígeno mejor caracterizadas de la piel y las únicas que encontramos en la epidermis en el estado quiescente. Fueron descritas por el alemán **Paul Langerhans** en **1868** y constituyen entre el **2-8%** de la población total de células epidérmicas de la piel normal. En cuanto a su densidad, es máxima en la **cara y cuello** y mínima en las plantas de los pies. En una cuantificación tridimensional bastante precisa, se ha establecido una ratio notablemente constante de **una LC por cada 53 células epidérmicas** de otro tipo [20]. A diferencia de otras DCs, en condiciones de reposo las LCs epidérmicas se mantienen a través de la auto-renovación o mediante la proliferación de precursores hematopoyéticos radio-resistentes que residen en la piel. Sin embargo, en condiciones de inflamación, en los que existe una disminución de LCs, la repoblación de estas células está mediada por la migración de monocitos circulantes. [32]. Las LCs, se encuentran en su mayor parte en una posición **suprabasal**, aunque están distribuidas a lo largo y a lo ancho de las capas basal, espinosa y granulosa. De esta forma, las LCs extienden sus dendritas tanto en el plano horizontal (contactando con los queratinocitos) como en el plano vertical hasta el estrato córneo conformando una **red tridimensional**. Así se sitúan de forma ideal para el contacto con antígenos extraños y propios, incluida la flora comensal. Debido al recambio epidérmico de los queratinocitos, las LCs deben “moverse” dentro de la epidermis de forma lenta en sentido contrario a los KCs para poder mantener su posición habitual. La microscopía electrónica de las LCs muestra la presencia de un núcleo lobulado, citoplasma relativamente claro y un desarrollado retículo endoplásmico, aparato de Golgi y lisosomas. Este citoplasma contiene de forma característica unas pequeñas estructuras con forma de raqueta denominadas **gránulos de Birbeck**, que representan subdominios del compartimento endosómico de reciclaje y se forman en localizaciones donde se acumula la proteína **Langerina** (CD207; lectina del tipo C responsable de la generación de los gránulos de Birbeck) [33-35]. Otra de las características de las LCs es la expresión de **cadherina-E** (CD324) que les permite la unión a los queratinocitos y la **molécula de adhesión a células epiteliales (EpCam; CD326)**. Se ha descrito que el **factor de crecimiento y transformación beta (TGF- $\beta$ )** y la **IL-10** participan en el mantenimiento de las LCs de la epidermis en un estado “inmaduro” durante la etapa de quiescencia [36].



En cuanto a la **ontogenia** de las LCs, se postula que sus precursores se desarrollan en la epidermis a partir del **día +18** del desarrollo embrionario y presentan una alta tasa de proliferación *in situ* adquiriendo marcadores de superficie de forma progresiva durante el 2º-3er trimestre del embarazo: **HLA-DR, CD1c, Langerina y CD1a** [37]. Esta tasa de proliferación decrece significativamente al nacer. En la ontogenia de las LCs se han visto implicados un número de factores solubles que incluyen al **TGF- $\beta$**  y al **factor estimulante de colonias granulocito-macrofágicas (GM-CSF)**. En humanos, se han podido obtener células similares a las LCs *in vitro* a partir de progenitores hematopoyéticos CD34+ [38, 39], monocitos [40] y dDCs [41].

Atendiendo a la funcionalidad de las LCs, al igual que otras DCs poseen la capacidad de detectar un daño o proceso infeccioso, capturar antígenos y poner en marcha una respuesta inmune. La **maduración** de las LCs conlleva un aumento de la expresión de las moléculas del **CMH de clases I y II** así como de **moléculas coestimuladoras** (CD40, CD80 y CD86) y **receptores de quimiocinas** (CCR7). El **TNF- $\alpha$**  y la **IL-1 $\beta$**  establecen una señalización crucial para activar y amplificar la migración de las LCs, entre otros mecanismos, mediante la **inhibición de la expresión de cadherina-E** que permite a las LCs disociarse de los queratinocitos circundantes [42]. Estos procesos facilitarán que las LCs activadas migren al ganglio linfático regional en un tiempo relativamente prolongado (unas 72h), lo cual refleja el lapso temporal necesario para atravesar la membrana basal. Además, se ha visto que las LCs pueden liberar citocinas como la **IL-1** para promover la quimiotaxis y la activación de los linfocitos [43]. Una vez en el ganglio regional, las LCs muestran una potente capacidad de estimular a los linfocitos T naïve.

Con respecto a otra función específica de las LCs, se ha postulado que pueden tener **propiedades inmunorreguladoras** [44] que contrarrestan la actividad proinflamatoria de los queratinocitos circundantes. De esta forma, bajo condiciones de piel normal o no inflamada, las LCs transportan componentes específicos de la piel a los ganglios linfáticos de drenaje, impidiendo así la inmunización y manteniendo la tolerancia inmunológica periférica contra autoantígenos epidérmicos [42] [45]. En las enfermedades inflamatorias de la piel, se ha descrito que las **LCs están disminuidas en la epidermis de los pacientes con psoriasis, sarcoidosis y dermatitis alérgica por contacto**, entre otras patologías; asimismo, sus funciones se deterioran por la exposición a radiación UV, especialmente UVB.

### **DERMIS: CÉLULAS DENDRÍTICAS DÉRMICAS**

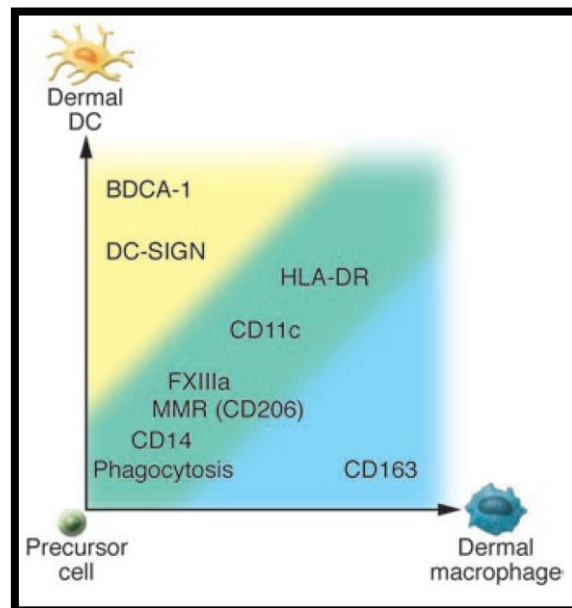
Mientras que las células de Langerhans son componentes celulares bien caracterizados, las **células dendríticas dérmicas (dDCs)** han sido objeto de estudio en menos ocasiones [46, 47]. Al principio incluso se pensaba que las DCs encontradas en la dermis, se correspondían con aquellas LCs que migraban hacia los ganglios linfáticos de drenaje. Sin embargo, en estudios in situ y por citometría de flujo, se ha comprobado que sólo una pequeña población (1-2%) de las DCs encontradas en la dermis conservan una alta expresión de CD1a y Langerina (LCs en migración, presumiblemente).

Los precursores de las células dendríticas dérmicas se detectan a las **9 semanas** de vida embrionaria y expresan marcadores como **CD14, HLA-DR y CD36** [48]. Inicialmente, en estado de piel normal, se describía la presencia de células dendríticas dérmicas mieloides (mDcs, CD11c+ residentes en la dermis) para diferenciarlas de la subpoblación de células dendríticas plasmacitoides (DCs, CD123+) que sólo estaban presentes en la piel inflamada.

Las dDCs son particularmente abundantes en la dermis papilar y la dermis reticular superior, frecuentemente en la proximidad de los vasos del plexo subpapilar. En el ser humano, en la piel **sana, las dDCs expresan CD11c y CD1c (BDCA1)**, que son marcadores de superficie ampliamente utilizados para identificar el principal subgrupo de DCs mieloides en sangre periférica. Zaba y cols ampliaron los hallazgos previos sugiriendo que la expresión de CD1c y CD11c es un marcador útil in situ para distinguir a las dDCs de los macrófagos [49]. Estos autores posteriormente propusieron diferenciar entre las dDCs en estado quiescente de las dDCs que se encontraban en la piel inflamada [50]. De hecho, estas **dDCs mieloides inflamatorias son CD11c+CD1c-**, lo cual indica que son células derivadas de precursores de DCs en sangre periférica que migran a la piel por señales inflamatorias o quimiotácticas.

La diversidad de las **células del sistema monocito-macrofágico de la dermis** se refleja en la flexibilidad o plasticidad en sus funciones. Por ejemplo, las células dendríticas inmaduras, incluyendo a las dDCs pueden actuar como fagocitos que es una función habitualmente atribuida a los macrófagos [51]. De forma alternativa, los macrófagos, que normalmente actúan como células fagocíticas pueden también ser potentes CPAs para los LT CD8+. Esto significa que es probable que los centinelas mononucleares residentes en la dermis posean un estado de cierta pluripotencialidad. **Dependiendo de los factores microambientales y el momento, pueden adquirir una función de CPA, permanecer como fagocitos residentes en la piel, o bien aumentar su capacidad migratoria** (Fig.10).





**Figura 10:** El presente esquema refleja la heterogeneidad y la funcionalidad flexible que existe en los subtipos de células mononucleares localizadas en la dermis normal. En un extremo se encuentran las DCs dérmicas que expresan BDCA-1 (CD1c) y DC-SIGN (CD209); en el otro extremo se encuentran los macrófagos, que expresan CD163. Dependiendo del microambiente de la piel y del estado de activación celular, pueden expresarse marcadores adicionales, y con ellos, una plasticidad funcional intermedia entre ambos polos de este espectro [52].

### 3.1.2 PIEL INFLAMADA

#### EPIDERMIS

#### CÉLULAS DENDRÍTICAS EPIDÉRMICAS INFLAMATORIAS (IDECs)

Las IDECs constituyen un segundo subtipo de DCs distinto de las LCs, que encontramos en la epidermis inflamada [53]. Estas células constituyen un porcentaje sustancial de la población CD1a+ que varía, por ejemplo, entre el 50% encontrado en epidermis afecta por dermatitis alérgica de contacto y el 66% en piel de pacientes con dermatitis atópica. Se ha descrito que en las **IDECs**, la expresión de el **receptor de IgE de alta afinidad (FcεRI)** y de **moléculas coestimuladoras** (CD80 y CD86) es mayor que en las LCs [54]. De hecho, se asume que estas células tienen una importancia cardinal en la patogenia de la **dermatitis atópica** por la elevada expresión de FcεRI, que permite la adquisición y presentación de alérgenos unidos a IgE de forma muy eficaz [55]. A diferencia de las LCs, las IDECs expresan el **receptor de manosa CD206** que es importante para la captación de antígenos manosilados derivados de bacterias y hongos [19]. También se ha

visto que las CPAs anteriormente descritas por Meunier et al, que infiltran la epidermis tras la exposición a altas dosis de radiación UVB podrían ser IDECs [56].

## DERMIS

### CÉLULAS DENDRÍTICAS PLASMACITOIDES (pDCs)

Las **células dendríticas plasmacitoides** (pDCs) representan una población menor de las DCs halladas en sangre periférica y se identifican tanto en órganos linfoides primarios como secundarios (típicamente expresan **CD123**, que es el **receptor  $\alpha$  de la IL-3**). Las pDCs tienen una función fundamental en la inmunidad contra virus debido a su extraordinaria capacidad para producir rápidamente grandes cantidades de **interferones de tipo I** (IFN- $\alpha/\beta$ ) contra la **infección vírica** que actúan activando la destrucción de células infectadas por microorganismos patógenos. Se considera que las pDCs actúan como un nexo entre la inmunidad innata y adaptativa puesto que intervienen parcialmente en el control de las DCs mieloides, los linfocitos T, linfocitos B y las células NK [57]. Esta característica única de las pDCs en la detección de la infección viral está unida a la **expresión endosomal** de los **receptores de tipo Toll 7 y 9** (TLRs, de su traducción al inglés) que reconocen respectivamente el **ARN y ADN** de cadena simple derivados de patógenos que invaden las células por rutas endocíticas [58]. Las pDCs no se encuentran de forma habitual en la piel normal en estado quiescente [59]. Sin embargo, aparecen en la dermis en **condiciones patológicas** como daño celular, enfermedades inflamatorias o autoinmunes (psoriasis, lupus eritematoso) y en algunas neoplasias [60]. En su reclutamiento se han visto implicados **factores quimiotácticos** como **CXCL9, CXCL10, CXCL11** a través del **receptor CXCR3 expresado en las pDCs**. Sorprendentemente, tampoco se han encontrado pDCs en lesiones de pacientes con dermatitis atópica, lo cual podría explicar la susceptibilidad de estos pacientes a las infecciones virales [61].



En el estado de piel inflamada, como es la **psoriasis**, otro factor más recientemente identificado es la **quemerina**. Ésta es una adipocina y **agonista del receptor 1 quimiocina-like (CMKLR1)** que se expresa en las células del sistema inmune innato. Se ha comprobado que las pDCs humanas expresan de forma selectiva el CMKLR1 [21]. De esta forma, la quemerina estimula la quimiotaxis de **pDCs y neutrófilos**, y se ha descrito que un **nivel alto de quemerina sistémica supone un marcador independiente de síndrome metabólico**. A este respecto, Albanesi y cols han identificado un aumento en la expresión de quemerina junto a un aumento en el número de pDCs y neutrófilos en la dermis de las lesiones iniciales de psoriasis [62, 63]. Asimismo, los niveles séricos de quemerina están significativamente

elevados en pacientes psoriásicos comparados con controles sanos [64]. También se han descrito niveles elevados de quemerina en pacientes con lupus eritematoso [65] y con liquen plano [66].

En condiciones normales, las pDCs pueden detectar ácidos nucleicos derivados de patógenos pero son tolerantes al propio ADN o ARN liberado a partir células necróticas o apoptóticas. La **ruptura de la tolerancia de las pDCs al ADN/ARN propio puede conducir a la autoinmunidad**. Este proceso implica la formación de inmunocomplejos (DNA-anticuerpos antiDNA) como ocurre en el lupus eritematoso sistémico, o la generación de **agregados del ADN/ARN propio con el péptido antimicrobiano LL-37 descrita en la psoriasis** [67]. De esta forma, estos ácidos nucleicos se convierten en potentes agonistas para los TLR7 y TLR9, induciendo la producción de IFN-I por las pDCs. Este proceso beneficioso en la inducción de una respuesta inflamatoria temprana y reepitelización de la piel dañada, supone una condición patológica en la psoriasis.

#### CÉLULAS DENDRÍTICAS QUE EXPRESAN 6-SULFO LACNAC (SLANDCS)

Las SlandCs se caracterizan por **carecer del antígeno leucocitario cutáneo (CLA**, del inglés). Este CLA constituye una modificación estructural de PSGL-1 (del inglés, P-selectin glycoprotein ligand-1), que se expresa de forma característica en las células que van a migrar a la piel; este carbohidrato promueve la unión de las **DCs a las selectinas P y E** y así favorece su migración. Las SlandCs, en lugar de CLA, expresan una modificación del mismo que contiene **6-sulfo N-acetil lactosamina** (6-sulfo LacNac) y como consecuencia estas células se ven imposibilitadas para unirse a las citadas selectinas [68]. Sin embargo, para llegar rápidamente a las zonas inflamadas emplean los **receptores para las quimiotaxinas C3a y C5a**. Se ha comprobado que las SlandCs están presentes en la piel afecta de psoriasis y dermatitis atópica. Tras estimulación con LPS se ha visto que estas células producen grandes cantidades de **TNF- $\alpha$** , así como elevados niveles de **IL-12** de forma rápida. Además se ha comprobado que pueden incrementar la secreción de IFN- $\gamma$  por las células NK [69]. En el caso de la psoriasis, los neutrófilos activados interactúan y potencian la acción de las SlandCs y las células NK que, junto a un ambiente con incremento de IL-12 e IFN-gamma, establecen **potentes fenómenos de retroalimentación positiva** [70].

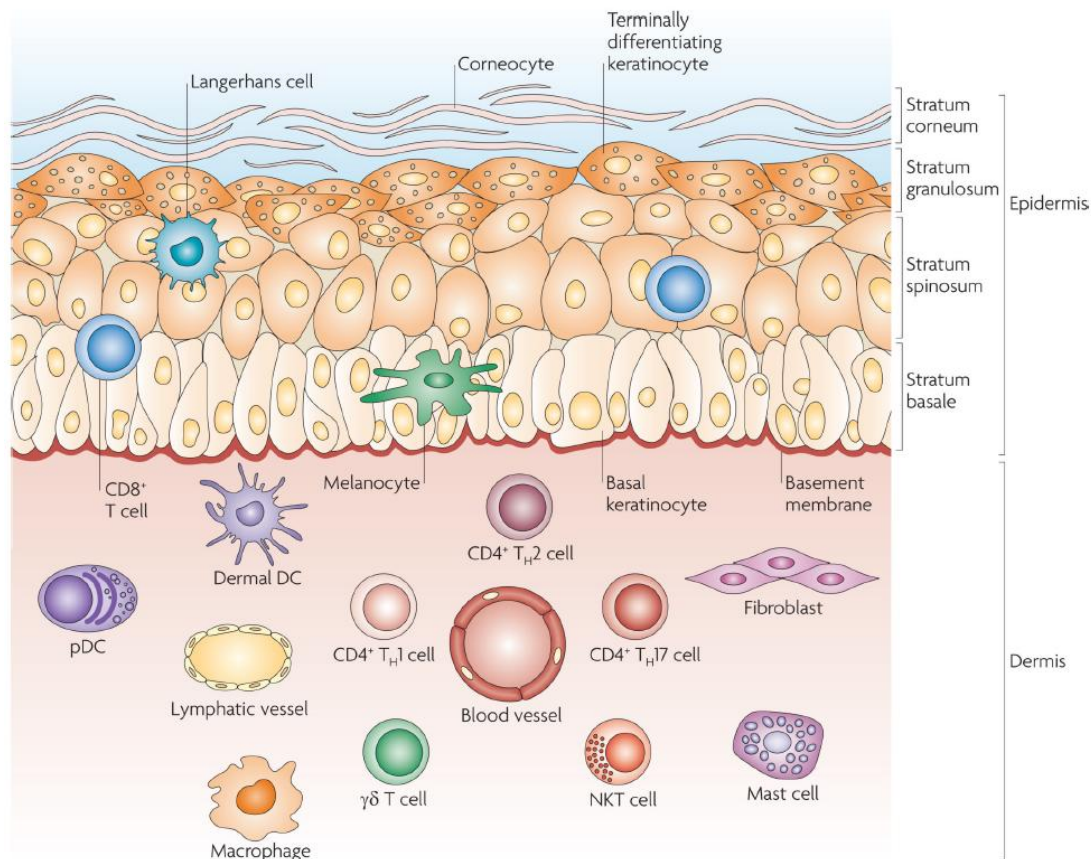
	<p>INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL EN INMUNODERMATOLOGÍA: DE LAS MOLÉCULAS INMUNORREGULADORAS MODULADAS POR RADIACIÓN ULTRAVIOLETA AL PAPEL DE LAS GALECTINAS EN PACIENTES CON PSORIASIS</p>	
---	---	---

## CÉLULAS DENDRÍTICAS PRODUCTORAS DE TNF-ALFA Y SINTASA INDUCIBLE DEL ÓXIDO NÍTRICO (TIP-DCS)

Las Tip-DCs se caracterizan por expresar **niveles elevados de moléculas coestimuladoras, CMH clase II y grandes cantidades de TNF-alfa y sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS)**, de ahí su nombre abreviado en inglés:” TNF-alfa and iNOS-producing DCs” (Tip-DCs) [71]. En el ser humano, se ha constatado la presencia de estas Tip-DCs en la dermis papilar y la unión dermo-epidérmica de la piel lesional **psoriásica** [72]. Tanto las dDCs como las Tip-DCs pueden inducir la polarización de los linfocitos T hacia una respuesta Th1 o Th17, pero sólo las Tip-DCs pueden ser inductoras de una población de linfocitos T activados capaces de producir **IL-17 e IFN-γ** de forma **simultánea** [73].

### 3.2 PARTICIPACIÓN DE LOS QUERATINOCITOS EN LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA

El **queratinocito** (KC) es una célula derivada del ectodermo embrionario y supone el principal tipo celular de la epidermis, constituyendo entre el **80-95%** del total de células. Éstas se disponen organizadas en varias capas (capa basal, espinosa, granulosa y córnea) que se diferencian progresivamente a partir de las células basales proliferativas. Intercaladas entre los queratinocitos, a distintos niveles, se encuentran otras células residentes: los **melanocitos**, las **células de Langerhans** y las **células de Merkel**. Otras células como los linfocitos son habitantes transitorios y sumamente escasos en la piel normal (Fig.11).



**Figura 11: Anatomía de la piel y sus células efectoras.** La estructura de la piel refleja la complejidad de sus funciones como barrera protectora, en el mantenimiento de la temperatura corporal, la captación de la información sensorial del ambiente y la función activa dentro del sistema inmunológico. La epidermis contiene el estrato basal, espinoso, granuloso y córneo, que es la capa más externa y responsable de la vital función barrera de la piel. Las células especializadas de la epidermis incluyen a los MCs y las LCs. Raramente, se encuentran LT en los estratos basal y espinoso y suelen ser LT citotóxicos CD8+. La dermis se compone de colágeno, fibras elásticas y fibras de reticulina. La dermis contiene muchas células especializadas, como los subtipos de DCs entre las que se incluyen las DCs dérmicas y las DCs plasmacitoides y los subtipos de LT, incluyendo los

LTCD4+TH-1, TH-2 y TH-17, los LT $\gamma$  y las células T/NK. También podemos encontrar macrófagos, mastocitos y fibroblastos. No se muestran en el esquema los vasos sanguíneos, linfáticos ni los nervios presentes en la dermis [74]

Las células de la capa córnea (corneocitos) de la epidermis son las que proporcionan el refuerzo mecánico, la hidratación, la iniciación de la inflamación mediada por citocinas y la protección del daño por exposición a la radiación UV.

De esta manera, la epidermis forma una barrera eficaz contra gérmenes patógenos, sustancias extrañas y evita la pérdida transepidérmica de agua. Se ha comprobado también su participación o influencia en distintas funciones de la piel como son la composición de la matriz extracelular, su crecimiento y diferenciación, la defensa antimicrobiana, la inflamación y la curación de las heridas.

En cuanto a su participación en la **respuesta inmunológica**, los KCs reciben las señales del medio externo y están capacitados para iniciar una respuesta inmunitaria diferencial: manteniendo a la flora comensal y destruyendo a los gérmenes patógenos. Son capaces de orquestar esta respuesta inflamatoria mediante la producción de citocinas, quimiocinas y péptidos o proteínas antimicrobianas. De esta manera, los KCs participan de forma muy activa en la **respuesta inmunitaria innata** de la piel. La iniciación de este proceso requiere de la presencia de receptores que reconozcan ciertos componentes microbianos altamente conservados evolutivamente, como son los denominados “**patrones moleculares asociados a patógeno**” (pMAPs). Entre estos pMAPs encontramos a los lipopolisacáridos (LPS), los peptidoglicanos, el ácido lipoteicoico, la flagelina y/o los ácidos nucleicos. Entre los receptores que reconocen pAMPs mejor caracterizados y que son expresados por los queratinocitos encontramos a los **receptores de tipo Toll**. Los KCs expresan los **TLRs 1, 2, 4, 5 y 6** asociados a la superficie celular y los **TLRs 3 y 9** de localización endosomal (Fig. 12) [75, 76]; además, se ha visto que se puede inducir la expresión del **TLR 7** mediante la activación del TLR 3 por el ARN de doble cadena, favoreciendo la respuesta antiviral [77]. La activación de los TLRs en KCs humanos conlleva la activación de una respuesta inmune de tipo Th1 predominantemente y a la producción de interferones de tipo I [78].

Los KCs son también una fuente importante de **quimiocinas** y expresan receptores de éstas, por lo que pueden modular la respuesta inmune al atraer distintos tipos celulares hacia la piel (ver Tabla 3).



Tabla 3: Quimiocinas expresadas por los queratinocitos y células cutáneas sobre las que influyen.

QUIMIOCINAS	CÉLULAS SOBRE LAS QUE ACTÚAN
CCL20, CXCL9, CXCL10, CXCL11	LINFOCITOS T ACTIVADOS [79]
CXCL1, CXCL8 (IL-8)	NEUTRÓFILOS
CCL20	PRECURSORES DE CÉLULAS DE LANGERHANS [80]

Entre los mediadores proinflamatorios secretados por los queratinocitos encontramos: **péptidos antimicrobianos catiónicos** (beta-defensinas y catelicidinas), **interleucinas** (IL-1, IL-6, IL-10, IL-18 e IL-15) [81] y **el factor de necrosis tumoral  $\alpha$**  (TNF- $\alpha$ ) [82].

Los **péptidos antimicrobianos (PAMs)** constituyen un importante mecanismo de defensa innato del individuo, mostrando una actividad antimicrobiana de amplio espectro contra bacterias, hongos, virus encapsulados... Los PAMs se expresan constitutivamente, pero su expresión se incrementa en respuesta a estímulos microbianos. Estas moléculas, tienen además una función fundamental como moléculas de señalización y nexo entre las respuestas inmunitarias innata y adaptativa. Entre los PAMs más importantes producidos por los KCs se incluyen a las **catelicidinas (LL-37)**, **beta-defensinas (BD1, BD2, BD3)** y la **proteína ribonucleasa antimicrobiana 7 (RNasa 7)** [83].

Las **beta-defensinas** son péptidos antimicrobianos de bajo peso molecular, que se encuentran en las capas superficiales de la epidermis. La **beta-defensina 2** fue descubierta en extractos de lesiones de pacientes con psoriasis [84] y no sólo es inducida por microorganismos, sino también por **TNF- $\alpha$**  e **IL-1**. Además hay datos que indican que estas beta-defensinas atraen a las DCs y a los linfocitos T por medio del receptor de quimiocina 6 (**CCR6**), proporcionando un vínculo entre la inmunidad innata y adaptativa en la piel [85].

Las **catelicidinas** son péptidos catiónicos que en el ser humano se codifican a partir de un solo gen. La proteína precursora humana **hCAP18** (*human cathelidicin antimicrobial proteína 18*) es producida por varias células en la piel aparte de los KCs (mastocitos, neutrófilos y células ductales de las glándulas ecrinas). Las proteasas de los neutrófilos procesan la hCAP18, originando la **molécula efectora LL-37** con marcada actividad antibacteriana, antimicótica y antiviral. En la dermatitis atópica, la LL-37 está regulada de

forma negativa, determinando, entre otros factores, que la piel de estos pacientes sea más susceptible a infecciones cutáneas. Se conoce que la expresión LL-37 en KCs es inducida por la  $1,25(\text{OH})_2$  vitamina  $\text{D}_3$ . Aparte de su actividad antimicrobiana, la LL-37 también tiene una función quimiotáctica y es capaz de modular las propiedades inmunológicas de las DCs y los linfocitos T [86]. En este contexto, se sugiere que los **queratinocitos de los pacientes con psoriasis pueden contribuir a la ruptura de la tolerancia inmunológica mediante la producción de LL-37** [87].

La **RNasa 7** es una proteína básica de 14.5 kDa que supone una de las principales proteínas catiónicas de la piel sana en el ser humano. Aparte de su secreción constitutiva, la RNasa 7 también podría ser un péptido inducible. Esto se deduce a partir de la observación de niveles de RNasa 7 elevados en la piel psoriásica y de que su expresión génica está incrementada cuando los KCs contactan con bacterias.

En cuanto a la producción de interleucinas por los **KCs**, las líneas de evidencia más recientes sugieren que éstos son una **fuentes fundamental de IL-1** en la piel [88]. Asimismo, son cada vez más numerosos los estudios que refuerzan la importancia de los KCs como sensores de peligro a través de sistemas de alerta como el denominado inflamasoma (Fig.12) [2]. El **inflamasoma** es un gran complejo multiproteico localizado en el citoplasma de las células que está compuesto por: un **dominio ligador de nucleótidos** (con repeticiones ricas en leucina, de forma análoga a los TLRs), una **proteína adaptadora** (*adaptor protein apoptosis-associated speck-like protein*) y la **procaspasa-1**. Este complejo del sistema inmune innato tiene dos funciones fundamentales: el reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógeno y estimular la reacción contra éstos mediante la activación de citocinas proinflamatorias. En la última década se ha establecido que la exposición a ciertos estímulos como la **radiación ultravioleta, activa el inflamasoma** en los KCs humanos y de esta forma se secreta la forma activa de IL-1 $\beta$  [5, 89] [90, 91].



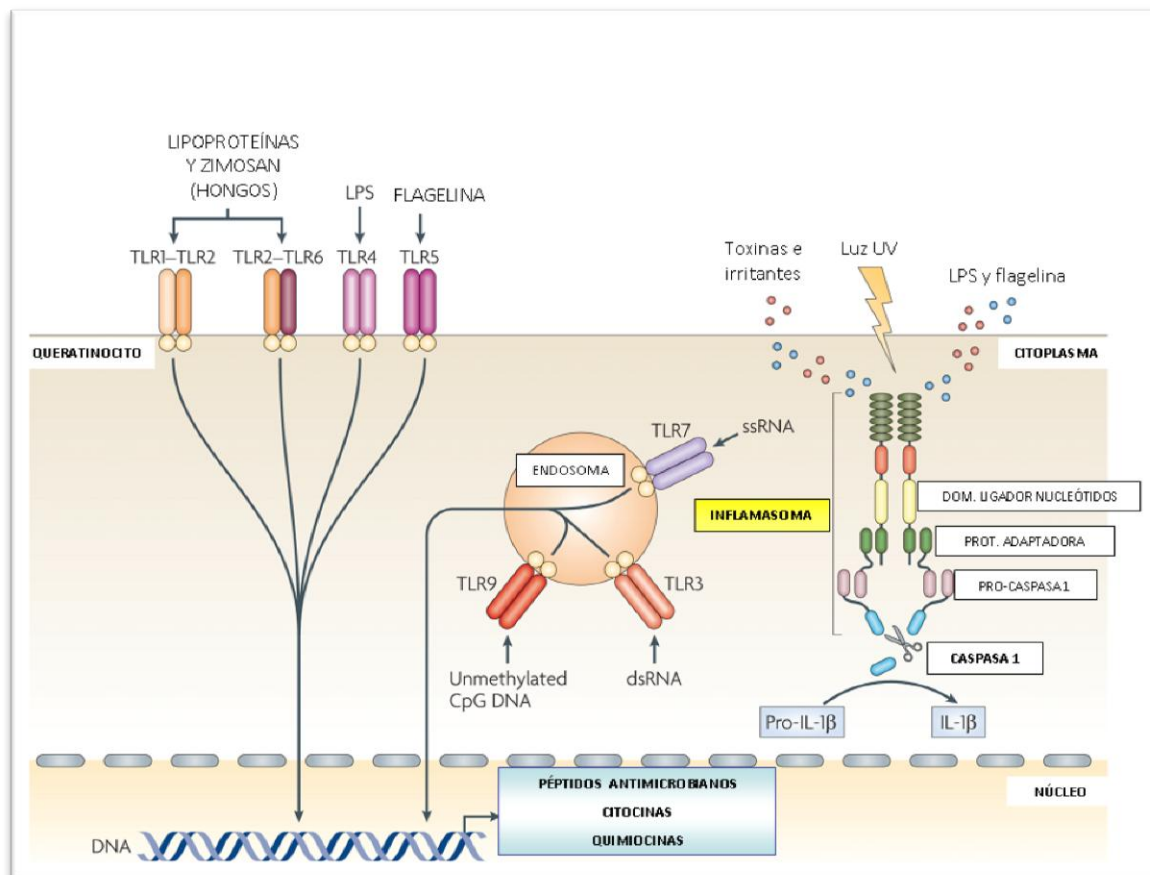


Figura 12: Esquema de la respuesta inmunológica llevada a cabo por los queratinocitos a través de los receptores Toll-like y el inflamasoma. Modificado de [76].

La **IL-1** es una citocina pro-inflamatoria con un amplio rango de efectos biológicos, tanto locales como sistémicos (algunos similares a los del TNF- $\alpha$ ). Éstos incluyen la activación de linfocitos T y DCs, así como la promoción de la maduración de los linfocitos B y su expansión clonal [92]. También puede producir fiebre, vasodilatación, hipotensión e incremento de la sensación de dolor que puede resultar “destructiva” en aquellas patologías en las que su secreción está descontrolada (enfermedades autoinflamatorias, diabetes tipo 2, aterosclerosis, asma, enfermedad de Alzheimer, cáncer...)[93]. En la piel sana, los KCs secretan **pro-IL-1 $\alpha$** , **pro-IL-1 $\beta$**  y el **antagonista del receptor tipo I de la IL-1 (aRI-IL-1)** de forma constitutiva. Las respuestas biológicas de la IL-1 se hacen efectivas a través de su unión al **receptor tipo I de la IL-1 (RI-IL-1)** que comparte el mismo dominio de señalización citoplasmática que los TLRs. Tanto la IL-1 $\alpha$  como la IL-1 $\beta$  se unen al RI-IL-1. La pro-IL-1 $\beta$  no puede activar al receptor, pero la pro-IL-1 $\alpha$  tiene la misma función biológica que la IL-1 $\alpha$  activa. En la mayoría de los casos, la pro-IL-1 $\beta$  es activada por la proteína **caspasa-1** que, a su vez, requiere ser activada en el **inflamasoma** [94]. La caspasa-1 es una proteasa

intracelular necesaria para escindir los precursores de IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-33 para producir citocinas activas proinflamatorias [95]. En condiciones normales, la actividad de la IL-1 también está regulada por la expresión del antagonista del receptor tipo I de la IL-1.

En algunas circunstancias patológicas, **los queratinocitos pueden actuar como células presentadoras de antígeno directamente a los LT** mediante la expresión de **moléculas de clase II de CMH** [4]. Se ha descrito esta capacidad principalmente en enfermedades con gran acúmulo de linfocitos T: enfermedad injerto contra huésped [96], psoriasis, dermatitis de contacto alérgica y liquen plano.

Se piensa que los queratinocitos son una fuente importante de mediadores que ayudan a mantener el desarrollo de las LCs [97]. Más aún, se postula que tienen una función importante en el mantenimiento de la **homeostasis inmunológica cutánea**. Por ejemplo, en piel murina se ha comprobado que la inducción de la expresión de CD40L en los KCs provoca una reducción de más de un 90% de las LCs epidérmicas y un aumento en el número células dendríticas dérmicas, lo cual sugiere un incremento en la migración de las LCs activadas por CD40 [98]. Esto se asocia además al hallazgo en estos ratones de linfadenopatía masiva y formación de autoanticuerpos, sugiriendo una disrupción de la tolerancia de los linfocitos T frente a antígenos cutáneos.

### 3.3 EL MELANOCITO COMO CÉLULA INMUNE

Los melanocitos (MCs) son células derivadas de la cresta neural de morfología dendrítica y que representan en torno al **2-5%** de las células de la epidermis. En el proceso de embriogénesis, los melanoblastos en su migración también alcanzan el tracto uveal, la cóclea y las leptomeninges (Figs.13 y 14).

En la piel se considera que existe una proporción aproximada de un melanocito por cada 5-6 queratinocitos basales, pero la máxima densidad de melanocitos se halla en los genitales y en la cara. Se encuentran 2 poblaciones distintas de MCs, una localizada en la capa basal de la epidermis interfolicular y otra que se sitúa en los folículos pilosos [99]. La principal función de los MCs es la síntesis del pigmento **melanina** que es almacenada en orgánulos citosólicos denominados **melanosomas**, considerados lisosomas modificados [100]. Existen dos tipos de melanina: la eumelanina, de coloración marrón-negruzca, y la feomelanina de color rojo-amarillento.

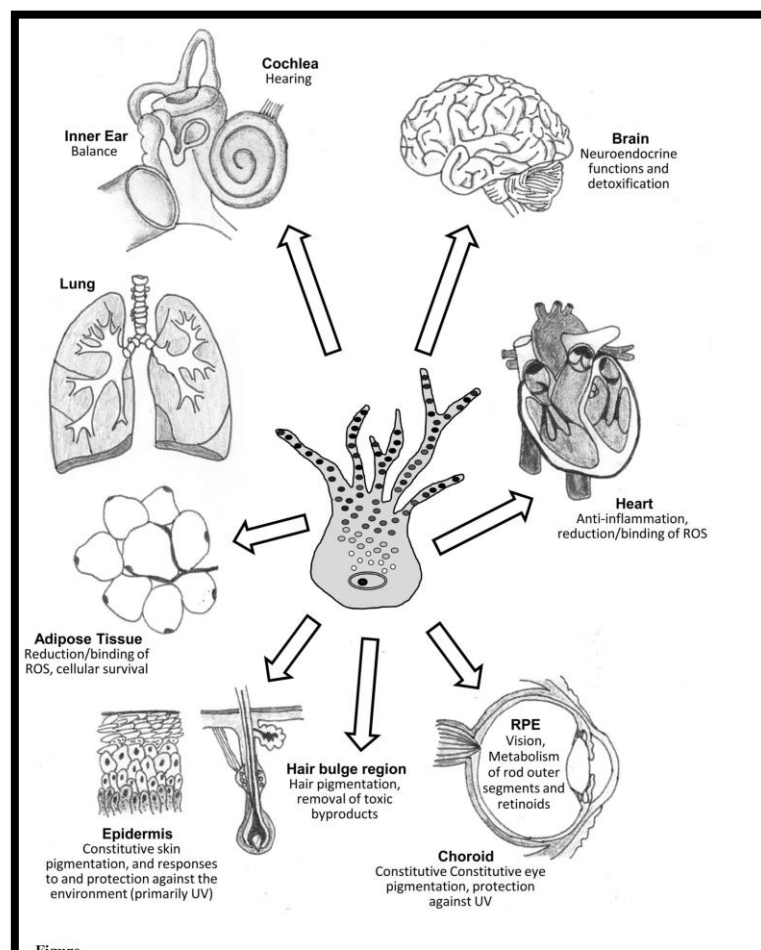


Figura 13: Esquema que muestra la distribución de los melanocitos en varios tejidos humanos que incluyen: piel, folículo piloso, tejido adiposo, pulmón, oído, cerebro, corazón y ojo. Extraído de [101].

El proceso de **producción de la melanina** tiene tres etapas que comienzan con la formación de los melanosomas (melanogénesis), el transporte de los mismos hacia las dendritas y su transferencia a los queratinocitos circundantes. La principal función de la melanina es la **protección del ADN** del daño inducido por la radiación UV; permite su absorción y dispersión transformando esta radiación en calor. Su localización es estratégica en este sentido, habiéndose demostrado con tinciones argénticas Fontana-Masson que los **melanosomas se organizan formando “caperuzas” en la porción supranuclear de los KCs** [102]. Se ha comprobado que la **proporción de MCs es la misma en todos los individuos independientemente de la etnia**. La pigmentación cutánea depende pues de la actividad melanogénica de los MCs, la proporción de melanosomas maduros y de su transferencia/distribución dentro de los KCs. En personas de fototipos claros habrá menor número de melanosomas, de pequeño tamaño y se degradarán más rápidamente en los KCs.

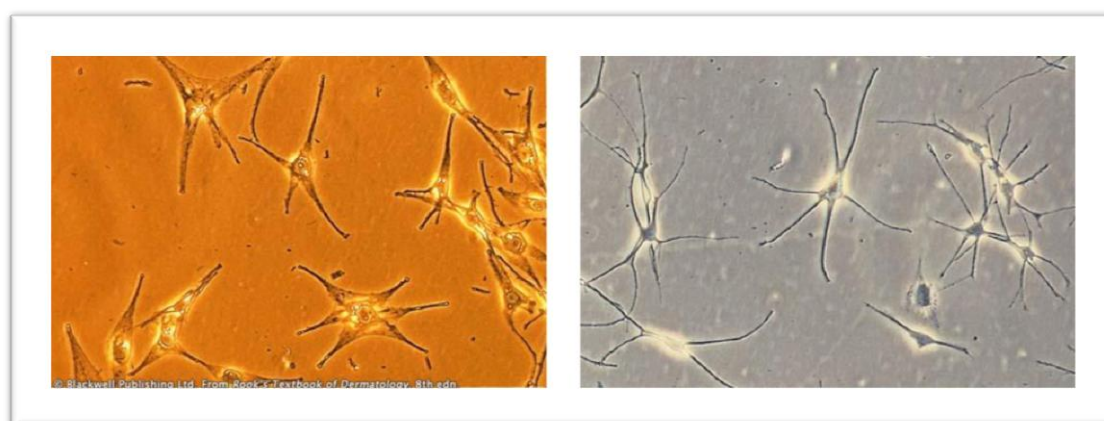


Figura 14: Imágenes de cultivos primarios de melanocitos (Extraído de Rook's Textbook of Dermatology, 8ªEd. Blackwell Publishing Ltd. 2010)

El término de “**unidad melánica epidérmica**”, acuñado por Fitzpatrick y Breathnach [103] hace referencia a la interacción específica entre un MC epidérmico y aquellos KCs circundantes a los cuáles transfiere los melanosomas mediante sus dendritas. Se describe un número constante de unos **36 queratinocitos (30-40) que son abastecidos de melanosomas por cada melanocito** [104]. Sin embargo, publicaciones recientes sugieren un concepto expandido de esta “unidad melánica” que debería ampliarse a los tres tipos celulares principales de la epidermis, dada su interrelación: **queratinocito-melanocito-**

**célula de Langerhans** (“the KLM unit”, keratinocyte-Langerhans-melanocyte) [105]. En cierta manera, podría simplificarse que estos tres pilares suponen una barrera mecánica (KCs), una barrera inmunológica/inflamatoria (LCs) y una barrera bioquímica (MCs) que actúan conjuntamente.

Las **interacciones queratinocito-melanocito** son críticas para la homeostasis y la diferenciación del melanocito, e influyen en su proliferación, la formación de dendritas y la melanización (Fig.15). Estas interacciones se producen principalmente a través las cadherinas. Trabajos recientes de varios grupos independientes han revelado que las **lectinas y sus ligandos glicosilados** pueden funcionar como pares receptor-ligando que median las interacciones melanocito-queratinocito [106-109]. La radiación UV por otra parte es la que induce la mayor parte de las señales derivadas de los KCs. Dentro de esta interrelación se piensa que la **hiperpigmentación postinflamatoria** está relacionada patológicamente con mediadores inmunes proinflamatorios como la **IL-1 $\alpha$** , **IL-1 $\beta$** , **IL-6** y **TNF- $\alpha$**  que pueden ser producidos por los queratinocitos [110].

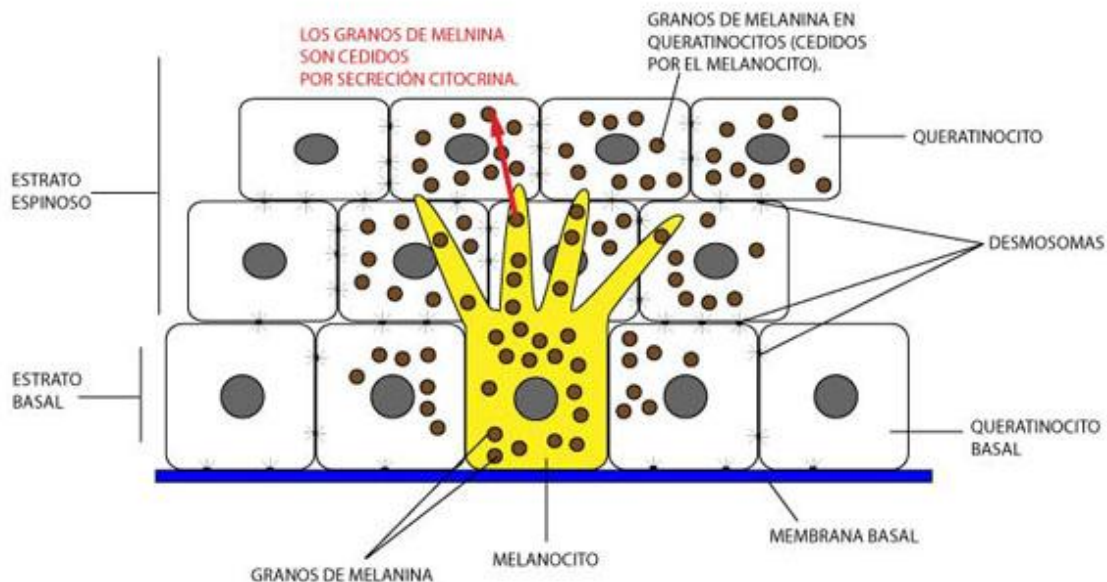


Figura 15: Interacción melanocito-queratinocito, transmisión de los melanosomas.

La regulación de los melanocitos humanos es muy compleja e influye no sólo el efecto estimulador directo de los **rayos UV** sino factores **endocrinos** (p.e. estrógenos, pro-opiomelanocortina), **paracrinos** (prostaglandinas, factor de crecimiento fibroblástico básico, endotelinas) y **autocrinos** [111]. Los reguladores más importantes de la melanogénesis son



el **receptor de la melanocortina-1** (MC1R, de su traducción al inglés) y sus ligandos: la **hormona estimulante de melanocito  $\alpha$**  ( $\alpha$ -MSH) y la hormona **adrenocorticotropa** (ACTH) que se producen por escisión enzimática del precursor pro-opiomelanocortina (POMC) en melanocitos, queratinocitos y otros tipos celulares de la piel. Por otra parte, los MCs pueden actuar como **reguladores de la respuesta inmunológica** mediante la liberación de moléculas inmunosupresoras como **ACTH,  $\alpha$ -MSH, cortisol, corticosterona y otros esteroides**. Esta capacidad de secreción hormonal y regulación del medio interno les ha conferido también el reconocimiento como células neuroendocrinas [112].

La respuesta de los MCs en cultivo a la radiación UV implica una **detención del crecimiento** ("growth arrest") junto a un **incremento de la melanogénesis**. La exposición de la piel humana a la radiación UV induce la liberación de un importante número de **citocinas epidérmicas y factores de crecimiento** que se traducen en inductores de la proliferación de los melanocitos y/o la melanogénesis [113]. Con dosis subletales de UVB en MCs cultivados se ha comprobado la detención en fase G2 del ciclo celular junto a un aumento en la actividad tirosinasa (enzima fundamental en la síntesis de melanina) y el consiguiente incremento en la melanina [114]. La **exposición solar**, además de **aumentar la actividad tirosinasa**, también produce **elongación y mayor número de dendritas**, así como un **aumento del número y tamaño de los melanosomas**.

Históricamente los estudios en los MCs estaban centrados en la biología y fisiología de estas células como las únicas especializadas en la producción de melanina. Sin embargo, su localización y su forma dendrítica les sitúa, de forma análoga a las LCs como posibles células con implicación en la respuesta inmunitaria. Se han realizado estudios para comprobar la participación de los **melanocitos en la respuesta inmunológica de la piel**. Estas células expresan moléculas de **clase II del CMH**, moléculas de adhesión intercelular (**ICAM-1, VCAM-1**) y **CD40** (molécula co-estimuladora para linfocitos), pudiendo actuar como **células presentadoras de antígeno no profesionales** en determinadas circunstancias [115, 116]. Los MCs también pueden actuar como fagocitos y el pigmento melánico por sí mismo como barrera físico-química contra los microorganismos [117].

Además, se ha comprobado que los MCs expresan **receptores Toll-like (2-5, 7, 9 y 10)** de forma constitutiva y que su activación estimula la producción de citocinas proinflamatorias [118, 119]. De esta forma, los MCs responden a estímulos proinflamatorios produciendo **IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$**  [120], **IL-6, IL-8** [121] y **TGF- $\beta$ 1** en pequeñas cantidades [122].

Varios autores han estudiado la **respuesta a lipopolisacárido (LPS) de MCs** humanos en cultivo y se ha demostrado que el LPS incrementa la síntesis de melanina [118] y estimula la secreción de **IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$**  por estas células. Por otro lado, se conoce que la **IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  inhiben la proliferación de MCs** humanos y la melanogénesis y que el **TNF- $\alpha$**  puede producir incluso **apoptosis** de estas células [123, 124].



### 3.4 RADIACIÓN ULTRAVIOLETA, PIEL Y PSORIASIS

La **radiación ultravioleta (RUV)** es una radiación electromagnética no ionizante que posee la peculiaridad de producir reacciones fotoquímicas y cambios moleculares cuando se pone en contacto con materiales o tejidos. Constituye una pequeña parte del espectro de la **radiación electromagnética** que se encuentra entre la longitud de onda de los rayos X y la luz visible violeta (Fig.16). Fue descubierta por **Johann Ritter** en **1801** al poner de manifiesto su acción fotoquímica sobre las sales de plata.

Aunque en la práctica es frecuente hablar de forma indistinta de luz ultravioleta o radiación ultravioleta, realmente el término “luz” debería reservarse para aquellas longitudes de onda de radiación (400-700nm) que alcanzan la retina y provocan la sensación de visión. El término adecuado sería pues el de radiación UV [90].

La principal característica de la RUV es la posibilidad de producir excitaciones en los átomos, que provocan **reacciones químicas**. De esta manera, la RUV posee energía suficiente para extraer electrones externos de algunos átomos, redistribuir los átomos de las moléculas en nuevas moléculas o acelerar ciertas reacciones químicas. Una de las **acciones fotoquímicas** de interés es la realizada sobre el **oxígeno**. La RUV produce la separación de los dos átomos que forman la molécula de oxígeno; deja libre oxígeno atómico, que tiene una existencia muy corta, y se recombina rápidamente para formar oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) u ozono (O<sub>3</sub>).

Si atendemos a las características físicas de cualquier onda electromagnética, encontraremos 3 magnitudes fundamentales: la **frecuencia (f)**, la **longitud de onda (λ)** y la **energía**; éstas se relacionan entre sí por ser, tanto la frecuencia como la energía, inversamente proporcionales a la longitud de onda ( $\lambda = v/f$ , donde  $v$  es la velocidad de propagación de la onda). Si tenemos en cuenta una determinada fuente de RUV, la cantidad de energía incidente es conocida como la **exposición radiante, dosis de exposición o fluencia** (se mide en J/m<sup>2</sup>) y la tasa de dicha incidencia es la denominada **irradiancia, tasa de dosis o intensidad** (medida en W/ m<sup>2</sup>).

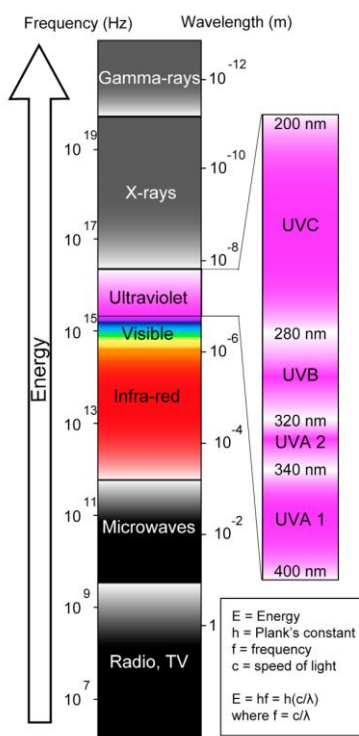


Figura 16: Espectro de radiación electromagnética. Extraído de [125].

El **sol** constituye la principal fuente de RUV, aunque ésta supone sólo un **5,4%** de toda la radiación que emite (5,1% UVA y 0,3% UVB), siendo la mayor parte **luz visible (62,7%)** y **radiación infrarroja (31,9%)**. El **espectro de la radiación UV** se divide de manera arbitraria según la longitud de onda en **UVC (100-280nm)**, **UVB (280-320nm)** y **UVA (320-400nm)**. Recientemente, la RUV-A se ha subdividido en **UVA-I (340-400nm)** y **UVA-II (320-340nm)**, los efectos biológicos de esta última banda son más parecidos a los de la radiación UVB. En general, la parte correspondiente a radiación UVC no alcanza la superficie terrestre porque es absorbida por la capa de ozono atmosférica, así como un 90% de la UVB aproximadamente (muy dependiente de la localización geográfica o la hora del día). Es por ello que el **95% de la radiación UV que llega a la superficie terrestre es radiación UVA**. La creciente contaminación atmosférica por clorofluorocarbonos es la responsable del aumento en el porcentaje de UVB e incluso UVC que puede alcanzar la Tierra (Fig.17).

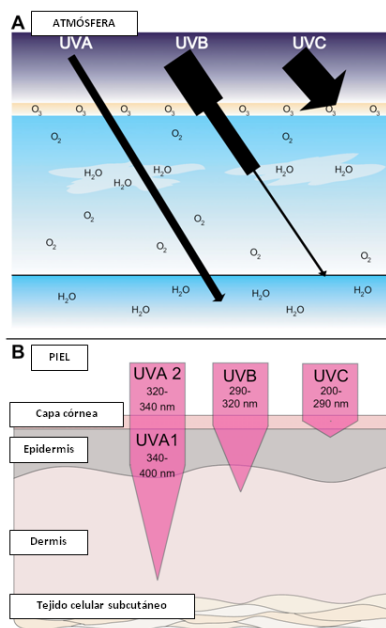


Figura 17: Capacidad de penetración de la RUV en la atmósfera (A) y en la piel (B). Modificado de [125].

Aparte del sol, existen **otras fuentes de RUV** como las emitidas espontáneamente por otras estrellas y también por fuentes artificiales: soldadura por arco eléctrico, lámparas de RUV para curado de tintas, pinturas y plásticos (exposición industrial), lámparas de “luz negra”, lámparas de uso en fotobiología dermatológica o en cabinas de bronceado e incluso los tubos fluorescentes de alumbrado general. Entre las fuentes artificiales de RUV empleadas con fines médicos o de investigación, encontramos las **lámparas de descarga de gas**, que son columnas de cristal o cuarzo en las que la RUV se produce mediante el paso de una corriente eléctrica a través de un gas, generalmente mercurio vaporizado o gas xenón. Las más simples son las **lámparas de arco de mercurio de baja presión**, que emiten radiación UVC a 254nm pero sólo se emplean con fines de **investigación o como germicidas**. La potente **lámpara de arco de xenón de alta presión** es una máquina de grandes dimensiones que, con los filtros adecuados aporta una **amplia emisión de radiación muy similar a la del sol** (incluyendo UV, radiación visible y una pequeña parte del espectro de infrarrojos), constituyendo los llamados “**simuladores solares**” que se emplean en investigación.

Cuando la **radiación UV interacciona con la piel**, el **5%** de la misma se refleja de forma difusa y el resto se transmite, se dispersa o se absorbe. La capacidad de **penetración en la piel es directamente proporcional a la longitud de onda**. La radiación transmitida por debajo de 300nm (UVB) es en gran medida atenuada por cromóforos de la epidermis como

el **ácido urocánico**, el **DNA**, **RNA**, **triptófano**, **tirosina** y **melanina**, mientras que el resto de radiación que traspasa la epidermis es absorbida presumiblemente por el **ADN**, **ARN** y **los aminoácidos de la elastina y el colágeno**. Por encima de 300nm (UVA), la RUV se transmite a la dermis tras una absorción variable por los cromóforos epidérmicos y seguida por la reflexión desde las fibras de colágeno dérmicas al medio externo; también es posible una mínima absorción por la hemoglobina intravascular, la bilirrubina tisular o el beta-caroteno contenido en el tejido celular subcutáneo.

La RUV es un desencadenante fundamental de **reacciones biológicas** mediante la interacción con cromóforos celulares que absorben fotones. La mayoría de los efectos de la radiación **UVA-I** se producen por **daño oxidativo**; en este caso, los precursores de la melanina actuarían como cromóforos celulares que, fotosensibilizados inducirían la generación de **especies reactivas de oxígeno y radicales libres**. En cuanto a la radiación **UVB**, la acción biológica es aún más directa, puesto que es absorbida por el **ADN celular**. La radiación UV también afecta a los **lípidos de la membrana plasmática** (que libera diacilglicerol), estimula la **liberación de factor activador de plaquetas** que parece ser responsable de la migración de los mastocitos [126] y activa a la tirosinasa mediante la proteincinasa C [127].

El **ADN es el cromóforo más importante de la piel** y las lesiones inducidas por la RUV pueden inhibir de forma grave el metabolismo celular provocando mutaciones o muerte celular [128]. De forma crónica, el acúmulo de estas mutaciones genéticas eventualmente produce la transformación maligna de la célula. Las denominadas **“sunburn cells”** son queratinocitos apoptóticos que resultan esenciales para evitar el inicio de cáncer cutáneo al limitar la expansión incontrolada de células mutadas. Sin embargo, estos KCs pueden inducir o exacerbar un estado de enfermedad autoinmune debido a que sus antígenos nucleares son expuestos hacia la superficie celular tras el daño inducido por la RUV [125].

Entre los fotoproductos del ADN, se incluyen los **dímeros de ciclobutano-pirimidina (DCP)**, **pirimidina (6-4) pirimidona (6-4PPs)** y **fotoproductos Dewar** (isómero de valencia de 6-4PP) [80] 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, productos por hidratación del ADN, enlaces cruzados ADN-proteína y ADN-ADN, todos ellos son ampliamente reparados, aunque no necesariamente de forma completa por procesos enzimáticos específicos denominados **“sistemas de reparación del ADN”**, entre los que encontramos a la **proteína supresora de tumores p53**. Estudios en ratones han mostrado que la RUV induce la **activación de p53**, probablemente mediante la vía del daño al ADN, estimulando la producción de

**proopiomelanocortina**, que es escindida en tres productos entre los que se incluye la hormona **MSH- $\alpha$** . La MSH- $\alpha$  se une al **receptor de melanocortina 1** desencadenando una cascada de señalización que lleva a la síntesis de melanina a partir de tirosina. De esta forma, la radiación UV en los **melanocitos** produce un aumento de la pigmentación cutánea que protege contra una futura irradiación UV que más comúnmente se denomina “bronceado”. Además de su papel en la síntesis de melanina, se ha descrito que la unión de **MSH- $\alpha$**  al receptor de melanocortina-1 induce la diferenciación **de células dendríticas tolerogénicas** capaces de provocar la expansión de linfocitos T reguladores (Tregs: CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>) tanto in vitro como in vivo. Los **Tregs suprimen la proliferación y la secreción de las células Th17** que intervienen en la patogenia de la psoriasis y se ha visto que inhiben la progresión de la enfermedad en un modelo de inflamación “psoriasis-like” en piel murina [129]. Este es un claro ejemplo del efecto de la RUV sobre la regulación de la respuesta inflamatoria.

Además del ADN, el **ácido urocánico (UCA)** es el otro cromóforo implicado en los efectos inmunomoduladores de la RUV [130]. El UCA se encuentra unido al estrato córneo y existe en niveles elevados en la epidermis, dado que la enzima urocanasa encargada de su degradación, está ausente en la piel. En presencia de la RUV, el ácido urocánico se isomeriza de trans- a **cis-** y el espectro de absorción que provoca esta transformación está muy cercano al espectro de absorción que produce inmunosupresión. En ensayos “in vitro” con KCs humanos se ha observado que el **isómero cis- del ácido urocánico** está implicado en la inducción de transcripción de genes y la síntesis de inmunomoduladores, actuando como un **posible agente inmunosupresor** [131].

**El daño epidérmico y dérmico producido por la RUV se traduce en inflamación** [132], con la consiguiente producción de citocinas y factores de transcripción nucleares. Todo esto conduce a un aumento en la producción de interleucinas, activación de las moléculas de adhesión celular, infiltración escasa de neutrófilos y moderada de células mononucleares y la liberación de mediadores de la inflamación como la **prostaglandina E<sub>2</sub>** y el **óxido nítrico**. El mecanismo mediante el cual la RUV produce esta activación del sistema inmune está aún muy debatido. Es posible que el daño al ADN sea la señal inductora con la consiguiente activación del **factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B)** que, a su vez interviene en la secreción de una gran variedad de mediadores inflamatorios incluyendo: **IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  y VEGF**.

Los **efectos del TNF- $\alpha$**  en una gran variedad de tipos celulares son de sobra conocidos y los KCs y los mastocitos son una importante fuente de TNF- $\alpha$  en la piel [133, 134]. Algunos de estos efectos son los siguientes:

1. En células endoteliales y fibroblastos provoca un incremento de la **expresión de moléculas de clase I del CMH**.
2. Induce la producción de **IL-1 $\alpha$** .
3. Incrementa la **expresión de moléculas de adhesión** como ICAM-1, VCAM-1 y selectina-E. Mediante este mecanismo, puede ayudar a la migración de neutrófilos y macrófagos a la piel expuesta a luz UV.
4. Promueve la formación de **“sunburn cells”**.

El efecto de la RUV sobre los **queratinocitos** consiste en la secreción de factores **paracrin**os que, a su vez incidirán en la **melanogénesis** (MSH- $\alpha$ , ACTH, prostaglandinas...). También se ha visto que producen una gran variedad de otras citocinas en respuesta a la RUV, por ejemplo la **IL-8**, una citocina quimiotáctica cuya secreción se ve incrementada por la radiación UV. La IL-8 es responsable en parte del **gran influjo de células inflamatorias** a la piel tras la exposición a RUV. Otras citocinas inducidas por la RUV responden a un espectro muy específico, como la **IL-12** que aumenta su expresión en respuesta a **UVA** pero no a UVB. Estudios recientes también sugieren que la RUV puede inducir la **respuesta inmune innata** mediante la estimulación de la producción de **péptidos antimicrobianos** en la piel humana como es el caso de la **psoriasina** [135].

Por otra parte, se ha propuesto el **daño por RUV** como una **señal de peligro**. Datos recientes que conectan la **producción de IL1 $\beta$  con el “inflammasoma”** apoyan esta teoría. Como recordatorio del apartado anterior, la IL1- $\beta$  se expresa normalmente en los KCs como un precursor inactivo. Tras la exposición a RUV (parece que interviene más la UVB), el precursor es escindido por la caspasa 1 para dar paso a la **forma activa de la IL1- $\beta$** . La activación de la caspasa-1 es dependiente de su reclutamiento a los inflammasomas, lo cual enlaza la **producción de citocinas inducida por UV con el sistema inmune innato** (Fig.12). La relación entre los inflammasomas y la producción de IL-1 $\beta$  inducida por RUV demuestra que esta vía también puede detectar el daño tisular. El mecanismo por el cual se produce esta respuesta no está aún establecido, pero parece que el ión Ca<sup>2+</sup> podría estar



implicado; de hecho, **la secreción de IL-1 $\beta$  en cultivo de KCs se suprime aportando un quelante del calcio.**

Por otra parte, entre los **cambios inmunológicos** producidos por la RUV encontramos **inmunosupresión local y sistémica** (ver Tabla 4 y Fig.18) [136]. Mediante radiación solar simulada (que incluye el espectro de UVA y UVB) se ha demostrado que en el ser humano se **suprime la reactivación de la inmunidad de memoria** frente a alérgenos de contacto y proteínas inyectadas intradérmicamente [137], así como la inducción de la inmunidad primaria [138]. De hecho, la RUV puede suprimir tanto la fase de **inducción** como el desarrollo de la **inmunidad celular** en la piel humana y murina en las **reacciones de hipersensibilidad por contacto**. Se ha confirmado que en humanos, dosis tan bajas de **UVA** como el equivalente a 6 minutos de exposición solar en la época estival puede suprimir la reactivación de la memoria inmunitaria [139].

De sobra son conocidos los intensos efectos de la RUV sobre la capacidad de las **células de Langerhans** en la presentación de antígenos y la estimulación de una presentación de antígeno anómala por los macrófagos CD11b [140]. Las LCs son mucho más sensibles a la RUV que los KCs y muestran un incremento de tamaño dependiente de la dosis de radiación, alteración de su morfología (pierden las dendritas) y una reducción de sus marcadores inmunológicos. Esta importante alteración en la capacidad de presentación de antígenos es **eficaz para evitar el procesamiento de los autoantígenos** que se liberarán de los queratinocitos apoptóticos y que podrían originar enfermedades autoinmunes. La disminución de las LCs de la piel, no sólo se produce por **apoptosis directa** inducida por radiación UV, sino por la **migración de estas células a los ganglios linfáticos** de drenaje [141]. Las LCs son inductoras fundamentales de linfocitos **T reguladores** tras la RUV. Estos linfocitos reguladores pueden inhibir la activación de linfocitos efectores o de memoria. Algunos autores apoyan que las LCs irradiadas con RUV **estimulan de forma preferente a linfocitos Th2** y suprimen la respuesta Th1, lo que explicaría algunos de los efectos inmunosupresores de la RUV. Evidencias recientes sugieren que las LCs estimulan la producción de **IL-4** que regula positivamente a los **linfocitos T-NK inmunosupresores** en las zonas de linfocitos T de los ganglios linfáticos regionales de drenaje [142].

Las citocinas **IL-12, IL-18 e IL-23** presentan la capacidad de reducir el daño al DNA inducido por la RUV mediante la **estimulación de reparación al DNA**, por lo que estas citocinas se han asociado a la protección contra el efecto inmunosupresor de la RUV. Sin embargo, estas citocinas también pueden inhibir la actividad inmunosupresora de los linfocitos T



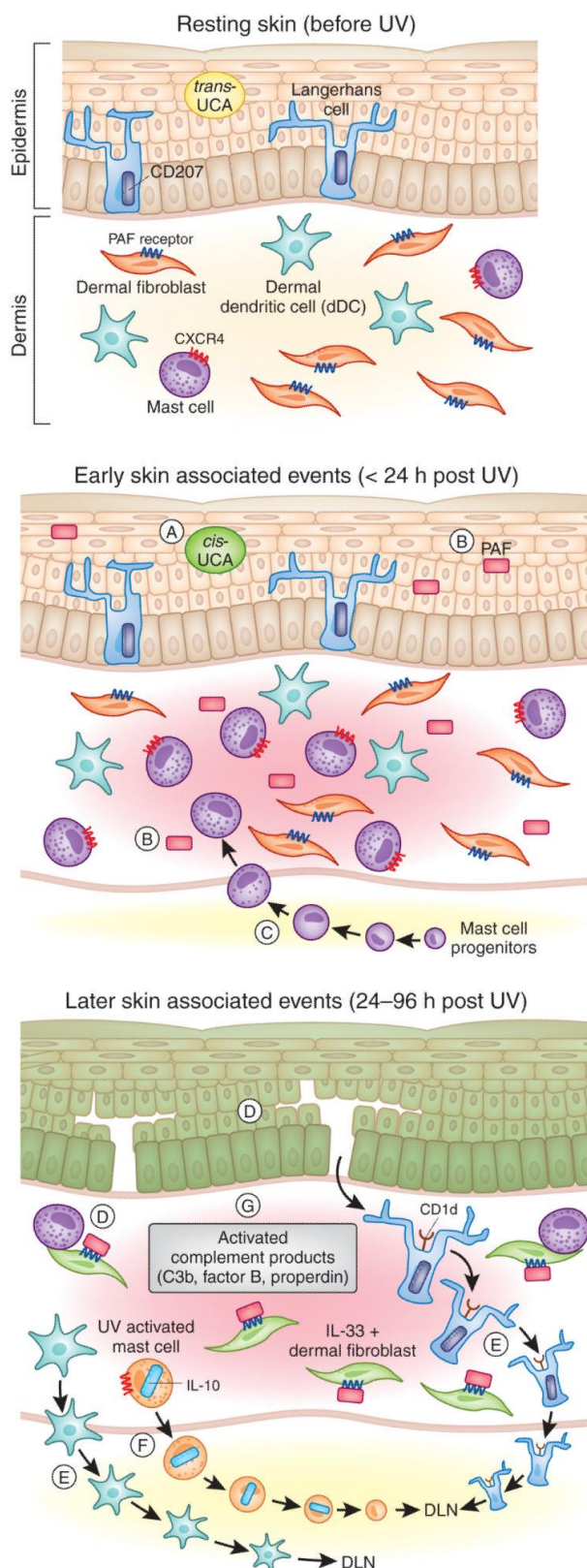
reguladores por un mecanismo aún no dilucidado [92]. Uno de los resultados de la disregulación de los acontecimientos moleculares y celulares en la piel es la **reducción de la activación de los linfocitos**. Se ha demostrado que la radiación **UVB** puede inducir directamente la apoptosis de los linfocitos T e inhibir la activación de los linfocitos T CD8+ citotóxicos por una vía aún desconocida [143]. Los **mastocitos** que migran de la piel a los ganglios de drenaje también intervienen de manera crucial en la inmunosupresión mediada por la RUV [144, 145].



La exposición UV puede provocar un estado de **inmunosupresión sistémica** que no se explica tan sólo por la disminución de las LCs de la piel y que se debe, en parte, a la liberación de **mediadores solubles** [146]. Entre los más importantes se encuentra la **IL-10**, que **inhibe** la producción de citocinas proinflamatorias como el **IFN-gamma** y la expresión en la superficie celular de **moléculas de clase II del CMH** y **moléculas coestimuladoras**. Tras la exposición a RUV, incluso los KCs pueden secretar IL-10, pero las células productoras más importantes, son los macrófagos que provienen de la médula ósea. Éstos comienzan a infiltrar la piel unas 6 horas después de la exposición a UV, alcanzando el pico máximo a las 48-72 horas.

Entre los **efectos beneficiosos de la radiación UV** en los humanos, encontramos la síntesis de vitamina D a partir del 7- dehidrocolesterol en los queratinocitos. Su metabolito más activo biológicamente es la 1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamina D<sub>3</sub> que, a su vez, promueve la síntesis de péptidos antimicrobianos y estimula la producción de DCs tolerogénicas y linfocitos T reguladores, con lo que contribuye a la inmunorregulación [147].

**Tabla 4: EFECTOS DE LA RADIACIÓN UV EN LA RESPUESTA INMUNE EN LA PIEL HUMANA.** Modificado de Hart PH, Gorman S, Finlay-Jones JJ, Nature Reviews Immunology 2011 [148].

MEDIADOR	EFEECTO DE LA RUV EN EL MEDIADOR	EVIDENCIA DE LA CONTRIBUCIÓN DEL MEDIADOR A LA RESPUESTA MEDIADA POR RUV
VITAMINA D	NIVELES AUMENTADOS	LA APLICACIÓN TÓPICA DE 1,25 (OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> REDUCE LAS RESPUESTAS INMUNES “RECALL”  LA APLICACIÓN TÓPICA DE ANÁLOGOS DE VITAMINA D REDUCE LA RESPUESTA DE HIPERSENSIBILIDAD POR CONTACTO
ÁCIDO CIS-UROCÁNICO	NIVELES AUMENTADOS	EL ÁCIDO CIS-UROCÁNICO TÓPICO REDUCE LA SENSIBILIZACIÓN AL HAPTENO DNCB
DAÑO AL ADN	NIVELES AUMENTADOS	LOS LIPOSOMAS QUE CONTIENEN ENDONUCLEASAS REVIERTEN LA SUPRESIÓN DE LA HIPERSENSIBILIDAD POR CONTACTO INDUCIDA POR RUV  LOS POLIFENOLES DEL TÉ VERDE QUE AYUDAN EN LA REPARACIÓN DEL DAÑO AL ADN, REDUCEN LAS RESPUESTAS DE HIPERSENSIBILIDAD DE CONTACTO AL DNCB
ÓXIDO NÍTRICO Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	PRODUCCIÓN AUMENTADA	EL INHIBIDOR DEL ÓXIDO NÍTRICO REVIERTE LA SUPRESIÓN INDUCIDA POR RUV DE LAS RESPUESTAS DE RECALL AL NÍQUEL
ENERGÍA Y FACTORES DE CRECIMIENTO EN CÉLULAS DE LA PIEL	NIVELES DISMINUIDOS	LOS SUPLEMENTOS CON NICOTINAMIDA PROTEGEN CONTRA LA REDUCCIÓN DE LA HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA INDUCIDA POR UVB, UVA Y RUV SOLAR-SIMULADA
NERVIOS PERIFÉRICOS SENSITIVOS Y NEUROPEPTIDOS	AUMENTO EN LA ESTIMULACIÓN DE NERVIOS SENSITIVOS Y PRODUCCIÓN AUMENTADA DE NEUROPEPTIDOS	LA CAPSAICINA REVIERTE LA SUPRESIÓN INDUCIDA POR RUV DE LAS RESPUESTAS RECALL A LOS DERIVADOS DE LA PROTEÍNA PURIFICADA TUBERCULINA



	<p>INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL EN INMUNODERMATOLOGÍA: DE LAS MOLÉCULAS INMUNORREGULADORAS MODULADAS POR RADIACIÓN ULTRAVIOLETA AL PAPEL DE LAS GALECTINAS EN PACIENTES CON PSORIASIS</p>	
---	---	---

**Figura 18: Esquema de los efectos de la RUV sobre la piel.** Tras la exposición a la RUV, en su fase precoz o inmediata (cuadro central), en la piel ocurren una serie de eventos inmunomoduladores, tales como: (A) isomerización del ácido trans-urocánico (UCA) a su isoforma cis-UCA con función inmunosupresora, (B) producción del mediador lipídico biológicamente activo, factor activador de plaquetas [149] que contribuye al desarrollo de cáncer cutáneo mediante la supresión tanto de la inmunidad adaptativa como de la reparación del DNA, y (C) reclutamiento de los mastocitos inmunomoduladores hacia la dermis, con un pico máximo a las 6 horas tras la exposición a la RUV. Estas manifestaciones tempranas precipitan una serie de efectos fotoinmunológicos tardíos (cuadro inferior), que incluyen: (D) la producción de IL-33 por los KCs y los fibroblastos, que posee propiedades inmunomoduladoras, (E) la migración de las LCs, dDCs y (F) los mastocitos CXCR4+ de la dermis a los ganglios linfáticos regionales (DLN). (G) La activación de los componentes del complemento en la piel (incluidos aquéllos asociados con la vía alternativa; Factor B y Properdina) también contribuyen a la inmunosupresión inducida por la RUV.

Extraído de [150].

### 3.5 INMUNOPATOGENIA DE LA PSORIASIS

La psoriasis es una **enfermedad inflamatoria crónica** que afecta aproximadamente a un **2-4%** de la población mundial [74], constituyendo así una de las enfermedades cutáneas mediada inmunológicamente más prevalente entre los adultos [151].

Aunque inicialmente se pudiera considerar una enfermedad sólo estigmatizante desde el punto de vista estético, y con una posible asociación a artritis psoriásica [152], progresivamente se va ahondando en esta enfermedad como un **proceso inflamatorio sistémico** [153]. En este contexto, cada vez son más enfermedades [154] con las que se ha visto asociada y mayor la morbilidad de los pacientes que padecen psoriasis (fundamentalmente en su forma moderada-grave). Entre las entidades más estudiadas directamente relacionadas con la psoriasis se encuentran: la enfermedad de **Crohn**, **diabetes** mellitus tipo 2 [155], **síndrome metabólico** [156], obesidad, enfermedad cardiovascular [157] y **depresión** [158]. Más aún, en un **estudio de cohortes** se ha demostrado que la psoriasis grave, que requiere un tratamiento sistémico para su manejo, se asocia con un **incremento en el riesgo de mortalidad**. En este estudio, los hombres y mujeres fallecieron una media de 3,5 y 4,4 años más jóvenes respectivamente en comparación con sujetos sin psoriasis (incluso tras ajustar los datos por los factores de riesgo clásicos de mortalidad) [159]. De lo expuesto anteriormente, se deduce que la psoriasis constituye un importante **problema de salud pública a nivel mundial**; por tanto, serán claves los avances en su conocimiento y en tratamientos cada vez más eficaces y menos agresivos.

En cuanto a su **patogenia**, se postula que la psoriasis es una compleja entidad que resulta de una combinación de **predisposición genética y desencadenantes medioambientales**. Por otra parte, parece ser que hay un considerable solapamiento entre los mecanismos que provocan la psoriasis y aquellos que conducen a otras enfermedades inflamatorias o autoinmunes. Los datos que indican una **etiología genética** provienen de la observación de que **más del 70% de los gemelos monocigóticos** desarrollan la enfermedad si su hermano está afectado. Más aún, una región llamada **PSORS1 en torno al HLA-Cw6 en el cromosoma 6p21.3** se ha asociado de manera sólida a la aparición de psoriasis de forma precoz, confiriendo alrededor del **50% de susceptibilidad** para padecerla. Se han asociado varios **factores ambientales** con el inicio de las lesiones de psoriasis o su agravamiento. Entre éstos se incluyen **trauma físico, infecciones** (e.g. estreptococo), tratamiento con **citocinas** (e.g. interferones), y otros **fármacos** [151]. En cuanto a las infecciones

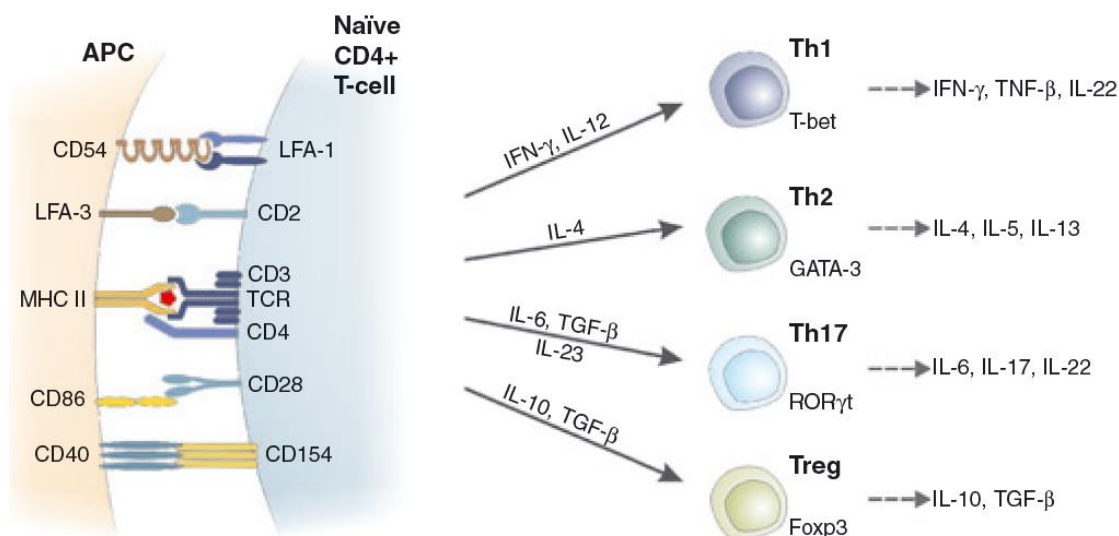
estreptocócicas, algunos investigadores postulan que la bacteria inicia la psoriasis debido a la presencia de antígenos estreptocócicos, que simulan proteínas de los queratinocitos y activan a linfocitos T auto-reactivos [160].

Nos centraremos aquí, fundamentalmente, en una breve descripción inmunopatológica de la psoriasis, ya revisada de forma exhaustiva en la literatura [161-164].

La psoriasis inicialmente se consideraba causada por la alteración de la proliferación y diferenciación de los queratinocitos debido a que la hiperplasia epidérmica produce las características histológicas y clínicas más evidentes de la enfermedad [165]. Posteriormente se consideró que los cambios epidérmicos en la psoriasis obedecían a una respuesta a la infiltración de células inmunes en la piel, llegando a un consenso general de que la psoriasis es una enfermedad inflamatoria mediada por linfocitos T [166]. No obstante, en este proceso inflamatorio [153, 167], intervienen tanto componentes de la inmunidad innata (KCs, DCs, neutrófilos, macrófagos, células NK y linfocitos TNK) como células de la inmunidad adaptativa (linfocitos T CD4+ y CD8+). En la actualidad, nuevamente ha renacido la controversia en relación con los cambios primarios en la patogenia de la psoriasis.

Existe una gran evidencia de que las manifestaciones de la enfermedad están orquestadas por linfocitos **T CD4+ productores de IFN-gamma (TH1) o IL-17 (TH17)** [164]. Hay dos aspectos de la interacción de las respuestas celulares en las lesiones psoriásicas, que son el resultado del **balance entre la activación de las células del sistema inmune y los factores producidos por los queratinocitos**. Las señales generadas por los leucocitos son capaces de estimular la proliferación de los queratinocitos y, a su vez, los queratinocitos pueden activar a las células del sistema inmune. Lo anterior pone de manifiesto la interrelación entre distintos tipos celulares de la piel involucrados en la patogénesis de la psoriasis [163]. Las respuestas de los LT específicos requieren de su activación a través de las DCs, una vez que éstas estimulan a los linfocitos T naïve (Fig.19) [12].

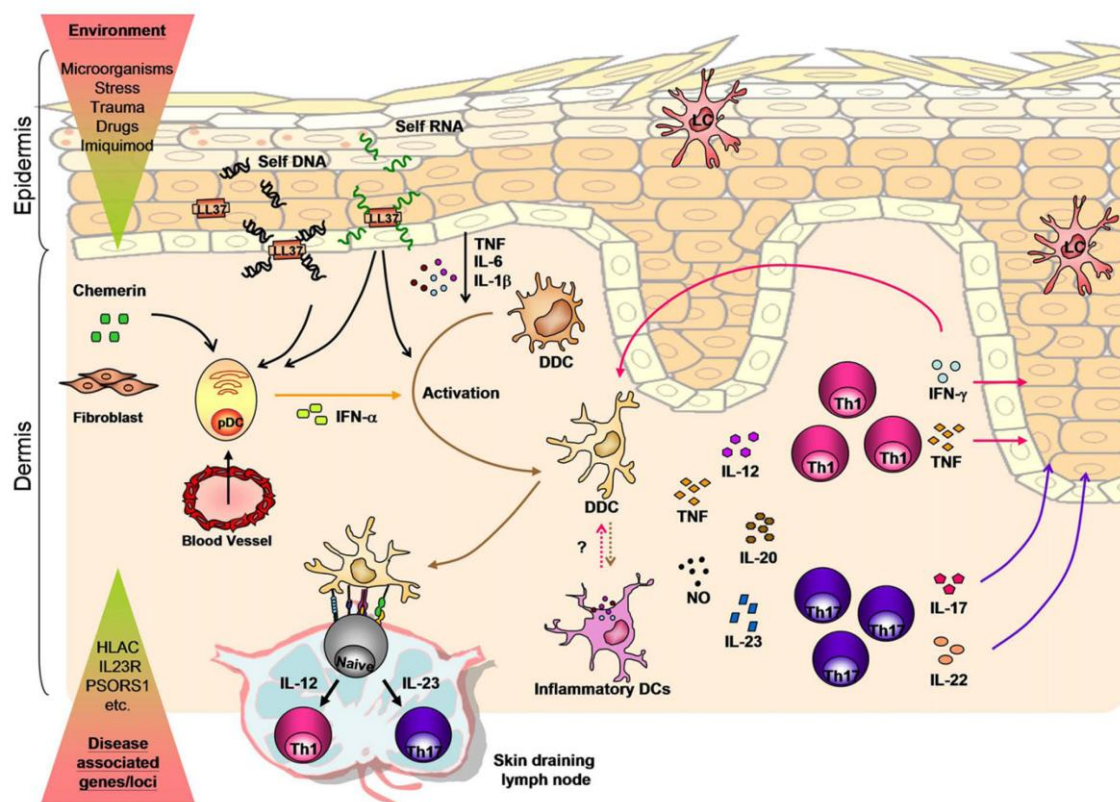




**Figura 19: La activación del linfocito T naíve por la célula presentadora de antígeno conlleva el desarrollo de distintos linajes de linfocitos TCD4+ con distintas propiedades.** La primera y segunda señales que emite la CPA al linfocito T es la responsable de la generación de linfocitos T efectores/memoria. El desarrollo de una u otra línea de LT depende del medio de citocinas presente durante la activación de los linfocitos T. Extraído de [168].

Las células dendríticas no sólo ejercen importantes funciones en la inducción de la inmunidad de los linfocitos T, sino que además participan en fenómenos de tolerancia, como se describió en la primera parte de esta introducción. Cada vez es más patente el papel clave de las células dendríticas en el inicio y el submantenimiento de la psoriasis (Fig.20). Las **placas psoriásicas contienen un número normal de células de Langerhans, y al menos otras dos poblaciones de DCs: células dendríticas epidérmicas inflamatorias (IDECs) y células dendríticas plasmacitoides (pDCs)**. Aunque las células dendríticas plasmacitoides representan una población menor en las lesiones, estas células producen grandes cantidades de IFN- $\alpha$ . Se sabe que la activación de las DCs plasmacitoides con la consiguiente producción de interferón alfa representa un evento clave en la activación de los LT autoinmunes [169]. De hecho, se ha identificado al péptido antimicrobiano (LL37) como un factor clave que media la activación de las pDCs en la psoriasis [170]. Por otra parte, las **DCs mieloides maduras son las mayores productoras de IL12 e IL 23**, estimulando así respuestas de tipo TH1 [171] [172]. Su actividad terapéutica se demuestra en la psoriasis con la eficacia de los anticuerpos monoclonales humanos contra la subunidad p40 de la IL12 [173] [174]. Las DCs de las lesiones psoriásicas están, además, caracterizadas por una intensa expresión de TNF- $\alpha$  y óxido nítrico inducible como lo demuestran inmunofluorescencias de células CD11c+ en las lesiones [72]. Sin embargo, existen pocos datos disponibles en humanos sobre las interacciones de los linfocitos T con células dendríticas, un proceso crítico para la iniciación de la respuesta inmune en pacientes con

psoriasis, así como de moléculas con actividad reguladora negativa sobre el sistema inmune.



**Figura 20: Perspectiva de la DCs en la patogénesis de la psoriasis.** En la fase inicial, las pDCs son reclutadas hacia la piel pre-psoriásica a través de la quemerina y activadas por el DNA o RNA propio que es liberado por los KCs y que forma complejos con el LL37. EL IFN- $\alpha$  liberado por las pDCs, los complejos LL37-RNA, así como las citocinas proinflamatorias derivadas de los KCs (TNF, IL-6 e IL-1 $\beta$ ), provocan la activación de las dDCs. Las dDCs migran a los ganglios linfáticos de drenaje donde promueven la diferenciación de los LT naïve a linfocitos TH1 o TH17. En las lesiones de psoriasis, las dDCs y las DCs inflamatorias producen IL-12, TNF, IL-20, radicales de óxido nítrico e IL-23 que activan a los linfocitos T residentes en la piel para producir citocinas proinflamatorias. Las citocinas TH1 y TH17 actúan sobre los KCs y ejercen un feedback positivo sobre las dDCs, manteniendo un estado inflamatorio amplificado que, en última instancia conlleva la formación de la placa de psoriasis. Extraído de [175].

Así pues, los **LT y las DCs**, junto a las citocinas y quimiocinas que éstas secretan, colaboran en crear un **entorno pro-inflamatorio en la piel** que estimula la proliferación de los KCs y las células endoteliales creando el patrón de crecimiento del tejido que se reconoce en la psoriasis. La **regeneración madurativa de los queratinocitos** que se aprecia en las placas de psoriasis estimula la liberación de algunas proteínas (e.g. **S100A7 y S100A9** *S100calcium-binding proteins A7 y A9*), que, a su vez actúan como factores quimiotácticos para los leucocitos. De esta manera, hay una interrelación entre ambos tipos

celulares, porque las citocinas liberadas por los leucocitos intraepidérmicos (**TNF e IFN- $\gamma$** ), activan la transcripción de genes que codifican moléculas de adhesión y quimiocinas en los KCs [176, 177] que posteriormente estimularán la migración de los leucocitos a la epidermis. Algunas de las citocinas producidas por los KCs activados (e.g. **VEGF-vascular endothelial growth factor-**, **PDGF-platelet-derived growth factor-**, **EGF-endothelial-cell growth factor-**) son mitógenos importantes para las células endoteliales y los fibroblastos de la dermis.

Como se resumen en la Fig.21, distintos factores ambientales desencadenan la psoriasis en individuos genéticamente predispuestos (portadores de alelos de susceptibilidad o genes asociados a la enfermedad). En la fase de iniciación, los **KCs** sometidos al estrés del medio liberan **ADN o ARN autólogo que forma complejos con el péptido antimicrobiano catelicidina (LL37)** que, junto a la **quemarina**, activa a las células dendríticas plasmacitoides (pDCs) que producen interferón alfa (IFN $\alpha$ ). La IL-1 $\beta$  derivada de los KCs, el TNF $\alpha$  y el IFN $\alpha$  derivado de las pDCs, estimulan la activación de las células dendríticas dérmicas (dDCs). Estas células **activadas migran a los ganglios linfáticos** de drenaje donde presentan un antígeno todavía desconocido (ya sea de origen microbiano o propio) a los linfocitos T naïve (Fig.22). De esta manera se promueve su diferenciación a **linfocitos T helper 1 (Th1) y/o linfocitos Th17**. Los linfocitos **Th1**, que expresan **CLA (cutaneous leukocyte antigen)**, **CXCR3 (CXC-chemokine receptor-3)** y **CCR4 (CC-chemokine receptor 4)** y los linfocitos **Th17**, que expresan **CLA, CCR4 y CCR6** migran vía linfática y hemática a la dermis psoriásica atraídos por las quimiocinas derivadas de los KCs (**CCL20, CXCL9, CXCL10 y CXCL11**) que, en último lugar, son los responsables de la formación de la placa de psoriasis.

Los linfocitos **Th17** secretan **IL-17A, IL-17F e IL-22**, que estimulan la **proliferación** de los KCs y la liberación de  **$\beta$ -defensina 1,  $\beta$ -defensina 2, S100A7 y S100A9** y las quimiocinas que reclutan **neutrófilos (CXCL1, CXCL3, CXCL5 y CXCL8)**. Además, las **DCs inflamatorias** producen **IL-23, radicales de óxido nítrico (NO) y TNF- $\alpha$** . En la unión dermo-epidérmica, los linfocitos T de memoria CD8+ que expresan **VLA-1 (very-late antigen-1)** se unen al colágeno de tipo IV, lo cual les permite penetrar en la epidermis y, de esta manera, perpetuar el estado proinflamatorio de la psoriasis. La **comunicación cruzada entre los KCS**, que producen **TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y TGF- $\beta$** , y los **fibroblastos**, que en respuesta liberan **KGF (keratinocyte growth factor)**, **EGF (epidermal growth factor)** y **TGF- $\beta$** , contribuyen a la reorganización del tejido y al depósito de matriz extracelular (por ejemplo colágeno y proteoglicanos).



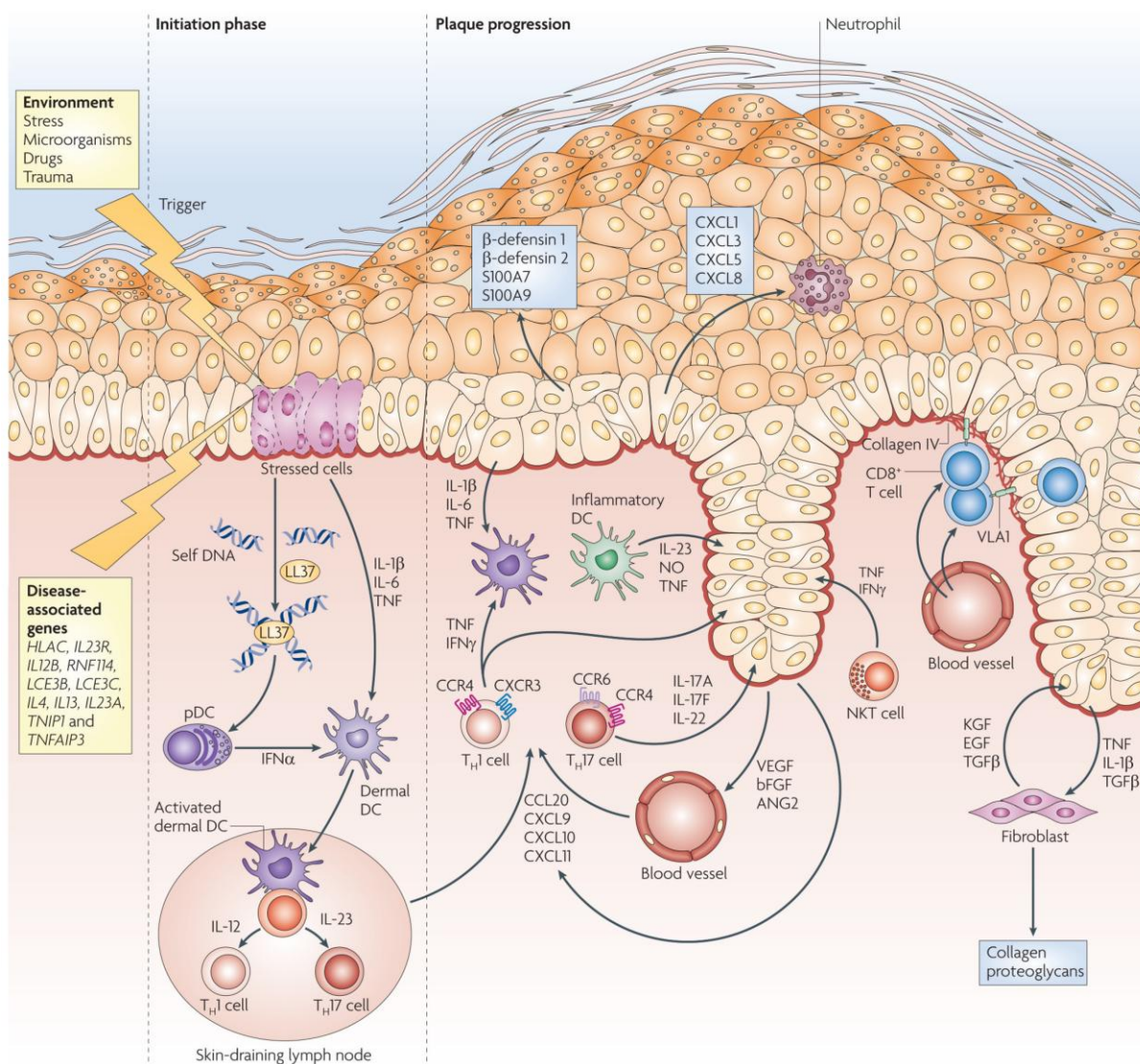
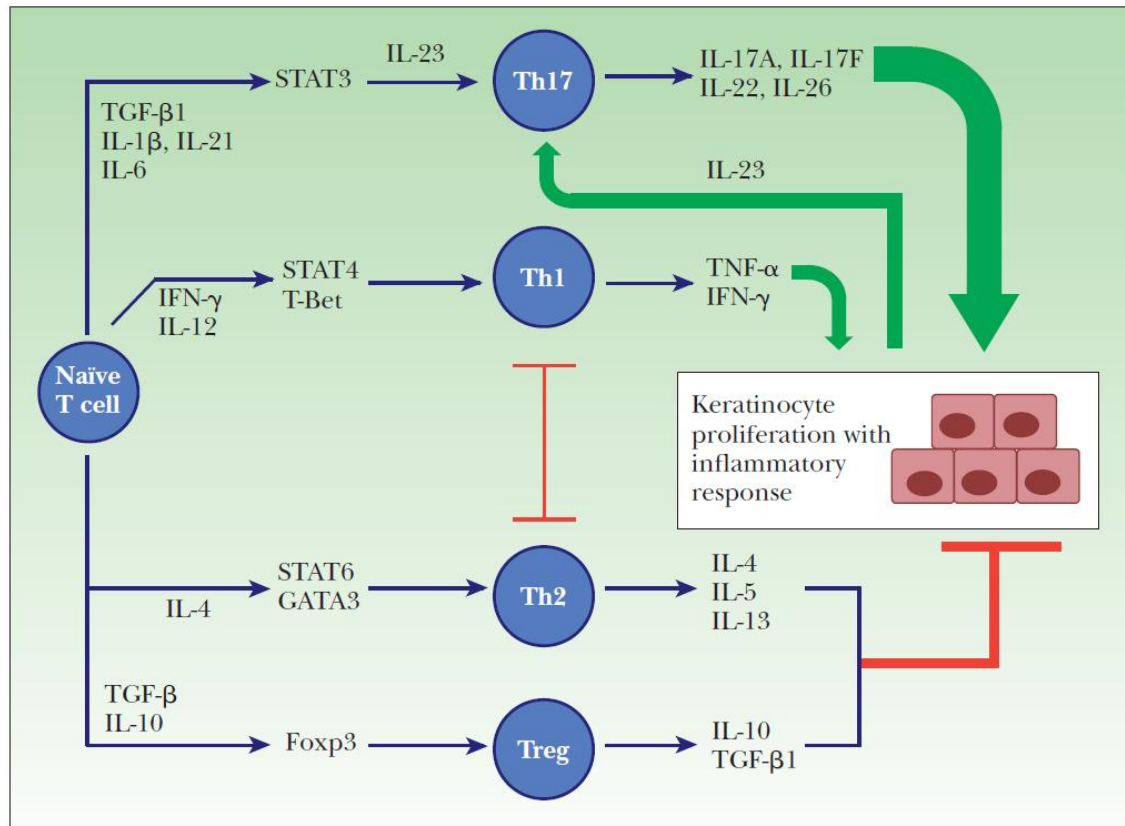


Figura 21: Immunopatogenia de la psoriasis. Explicación en el texto. Extraído de [2].



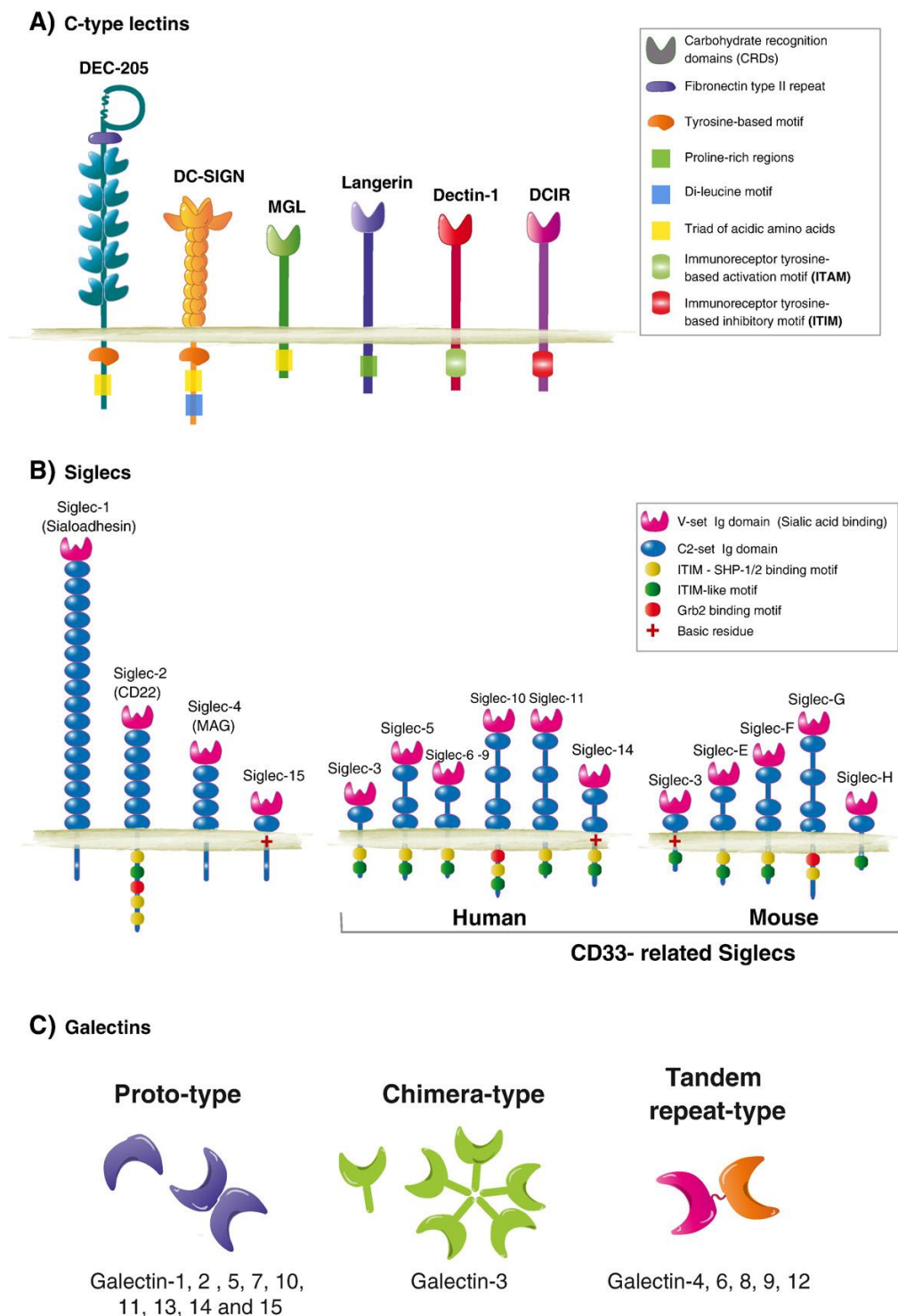
**Figura 22: Función de los distintos subtipos de linfocitos T CD4+ en la psoriasis.** Las citocinas proinflamatorias producidas por los LTh1 y LTh17 dominan el perfil de citocinas en la psoriasis. Éstos median la hiperproliferación de los KCs y desencadenan un “círculo vicioso” de inflamación. La IL-23 liberada por los KCs de la piel psoriásica, las DCs y los macrófagos, es crítica para el mantenimiento de la función de los LTh17. Los niveles de citocinas anti-inflamatorias liberadas por los LTh2 y los linfocitos Tregs podrían contrarrestar potencialmente el efecto de las citocinas Th1/Th17, pero en el caso de la psoriasis, estos niveles son tan bajos, que no es posible frenar la respuesta inflamatoria. Modificado de [153].

### 3.6 GALECTINAS Y PIEL

Si estudiamos una proteína que se expresa en la superficie de los linfocitos, células dendríticas, macrófagos o cualquier otra célula de mamífero, dicha proteína será glicosilada con casi total certeza; virtualmente, **casi cualquier proteína de la superficie celular, está glicosilada** (a excepción de la beta2-microglobulina). Las proteínas que unen glicanos y que no son enzimas (como las glicosiltransferasas o glicosidasas) se denominan **lectinas**, y hay varias clases de lectinas de mamíferos que regulan el desarrollo de la célula y su función inmunológica. Estas **clases de lectinas** incluyen [178] (Fig.23):

1. **Selectinas**: regulan la interacción de los leucocitos de sangre periférica con las células endoteliales.
2. **Siglecs**: unen ligandos que transportan ácido siálico (monosacárido ácido) para regular las interacciones celulares y la señalización en linfocitos y otros tipos celulares del sistema inmune.
3. **Lectinas de tipo C** (denominadas así porque su unión requiere de la presencia de calcio): son expresadas por múltiples tipos celulares y pueden ser glicoproteínas transmembrana que actúan como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) en células presentadoras de antígeno, o se encuentran en el suero de forma soluble y unen PAMPs para opsonizar patógenos.
4. **Galectinas (gal)**: una familia de lectinas muy conservadas que actúan típicamente como un andamiaje de proteínas de superficie celular para organizar las moléculas de superficie en dominios de membrana y, de esta manera, regular una gran variedad de vías de señalización intracelulares.





**Figura 23: Estructura de los miembros de las familias de las lectinas de tipo C (A), siglec (B) y galectinas (C).** (A) Miembros seleccionados de la amplia familia de las lectinas de tipo C que se expresan en las células dendríticas (DC-SIGN, MGL, langerina, Dectin-1 y DCIR). (B) Las glicoproteínas siglecs se dividen en sialoadhesina (Sn; Siglec-1), CD22 (Siglec-2), myelin-associated glycoprotein (MAG; Siglec-4) y los siglecs relacionados con CD33 que comparten una gran similitud de secuencias (Siglec-3, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11 y -14 en humanos y Siglec-E, -F, -G y -H en ratones). (C) Clasificación de las galectinas basada en su arquitectura (ver más adelante). Extraído de [179].

### 3.6.1 Generalidades

Las galectinas son un grupo creciente de **lectinas animales** con gran afinidad por los **betagalactósidos o residuos galactósidos** (unidades repetitivas [Gal $\beta$ 1-4NAcGlc] presentes en **N- y O-glicanos** de la **membrana plasmática** y de la **matriz extracelular**. Estas proteínas reconocen de forma específica unidades repetitivas, a través de un dominio altamente conservado, de **135 aminoácidos**, denominado **dominio de reconocimiento de carbohidratos** (del inglés, **CDR**) [94]. Actualmente, se han descrito 15 miembros de esta familia de proteínas en los mamíferos, las cuales se clasifican de acuerdo a su estructura como se representa en la Fig.24 [91]:

1. **Galectinas “prototipo”**: gal-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 y -15; poseen un único CDR.
2. **Galectina “quimera”**: la gal-3 es la única galectina descrita de este tipo y posee un CDR y otro dominio no relacionado que facilita su oligomerización [91].
3. **Galectinas con “repeticiones en tándem”**: gal-4, -6, -8, -9, y -12; estas gal poseen dos CDRs en una misma cadena polipeptídica.

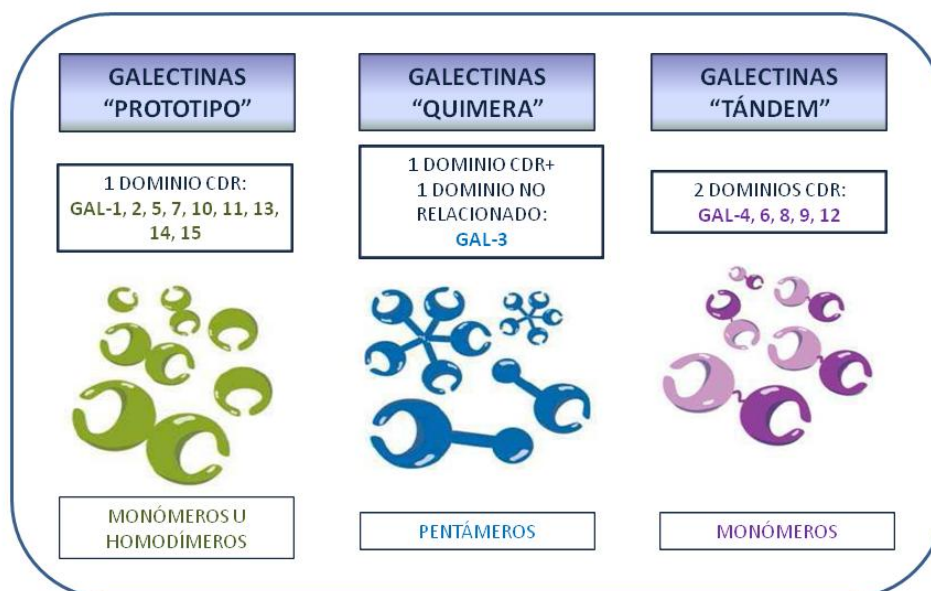
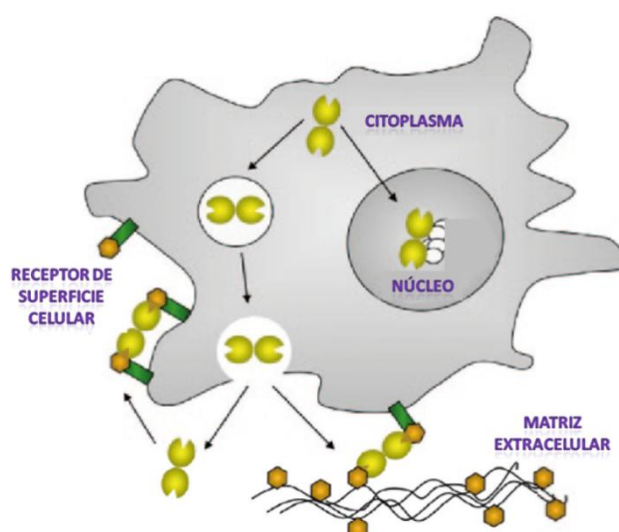


Figura 24: Clasificación estructural de las galectinas.

Las gal son proteínas **ampliamente distribuidas** en los tejidos. No obstante, mientras algunos miembros de la familia de las gal (como la gal-1 y -3) muestran un perfil de distribución muy amplio, otras como la gal-7, -10 y -12 tienen una distribución más restrictiva [179]. En el contexto de la **respuesta inmunológica**, en general, la expresión de gal es baja

en los linfocitos T naïve y en las células en estado quiescente, pero aumenta considerablemente tras un estímulo de activación y/o diferenciación, como en el caso de los linfocitos T, linfocitos B y macrófagos activados [180].

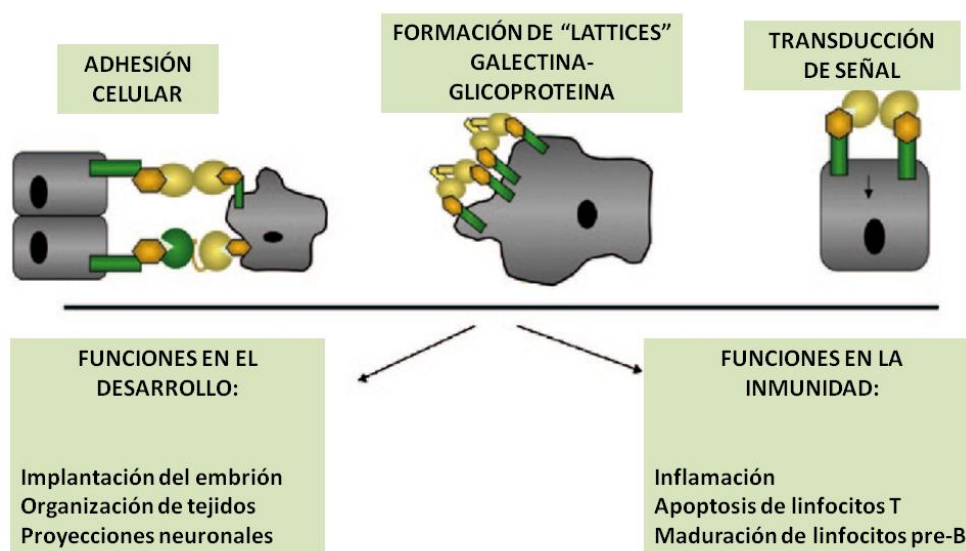
Las gal se sintetizan en el citoplasma y desde ahí, se dirigen al núcleo o se secretan al espacio extracelular, donde se unen a los glicanos de la superficie celular (unión lectina-carbohidrato) o de la matriz extracelular como se muestra en la Fig.25. De esta manera, las gal pueden localizarse en diferentes compartimentos celulares y ejercen diferentes funciones de acuerdo al sitio en el que se encuentren (Fig.26) [181]. Las gal, en su localización intracelular, pueden regular el crecimiento y la supervivencia de la célula al interactuar con proteínas citoplásmicas y nucleares, a través de interacciones proteína-proteína, lo que afecta a las vías de señalización intracelulares [182].



**Figura 25: Localización intra y extracelular de las galectinas.** Las gal se sintetizan en el citoplasma y pueden ser, bien translocadas al núcleo, o bien secretadas al espacio extracelular. Fuera de la célula es donde se unen a los glicanos de la matriz extracelular o de la superficie de la célula. Modificado de [91].

Las gal, en contraposición a las lectinas de tipo-C y las siglecs, que son receptores asociados a la superficie celular, **pueden actuar tanto dentro de la célula** mediante la modulación de vías de señalización **o extracelularmente** mediante la interacción con los glicanos N- y O- de los receptores de la superficie celular [183]. La posibilidad de formar dímeros o de oligomerizarse y decodificar la información que contienen los glicanos otorga a las galectinas el potencial de mediar la **comunicación célula-célula** y de participar en procesos de señalización mediante las clásicas **interacciones ligando-receptor** o mediante el establecimiento de **redes entre glicanos y proteínas** (los denominados “lattices”) en la

superficie celular [184]. Este ensamblaje de la membrana lipídica mediada por la unión a gal puede modular el recambio de receptores endocíticos, es decir, las vías de transducción que llevan a la activación de los linfocitos T y la secreción de citoquinas, o bien a la apoptosis, maduración, activación y tolerancia de los linfocitos B y, por último, a la activación de los neutrófilos que conduce a fagocitosis, explosión oxidativa y liberación de proteasas y citoquinas. De esta manera, se ha propuesto que los **“lattices” o red de glicoproteínas y gal, funcionan como un interruptor “on-off”** que regula la proliferación, diferenciación y supervivencia celular, incluyendo la respuesta inmunológica y la tolerancia inmune [185]. En un principio, se pensaba que las gal sólo se unían a glicanos endógenos (“propios”) y mediaban procesos del desarrollo, incluyendo la diferenciación celular y la organización de los tejidos, y más recientemente se ha comprobado su intervención en la regulación de la homeostasis inmune (Fig.26) [186]. En los últimos años, sin embargo, ha quedado claro que **las gal también se unen a glicanos de la superficie de microbios y parásitos potencialmente patógenos, y median el reconocimiento y las funciones efectoras de la inmunidad innata.**



**Figura 26: Funciones biológicas de las galectinas tras su unión a la superficie celular.** Las gal pueden unirse a los glicanos de las células vecinas o a las células y a la matriz extracelular provocando la adhesión celular, o bien, entre ellas sobre la superficie celular formando “lattices” y la activación de vías de señalización. Modificado de [91].

Las gal desempeñan un papel importante en diversos procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo la respuesta inmunológica e inflamatoria, el desarrollo y la progresión tumoral, la degeneración neuronal, la aterosclerosis o la diabetes entre otros (Fig.27).



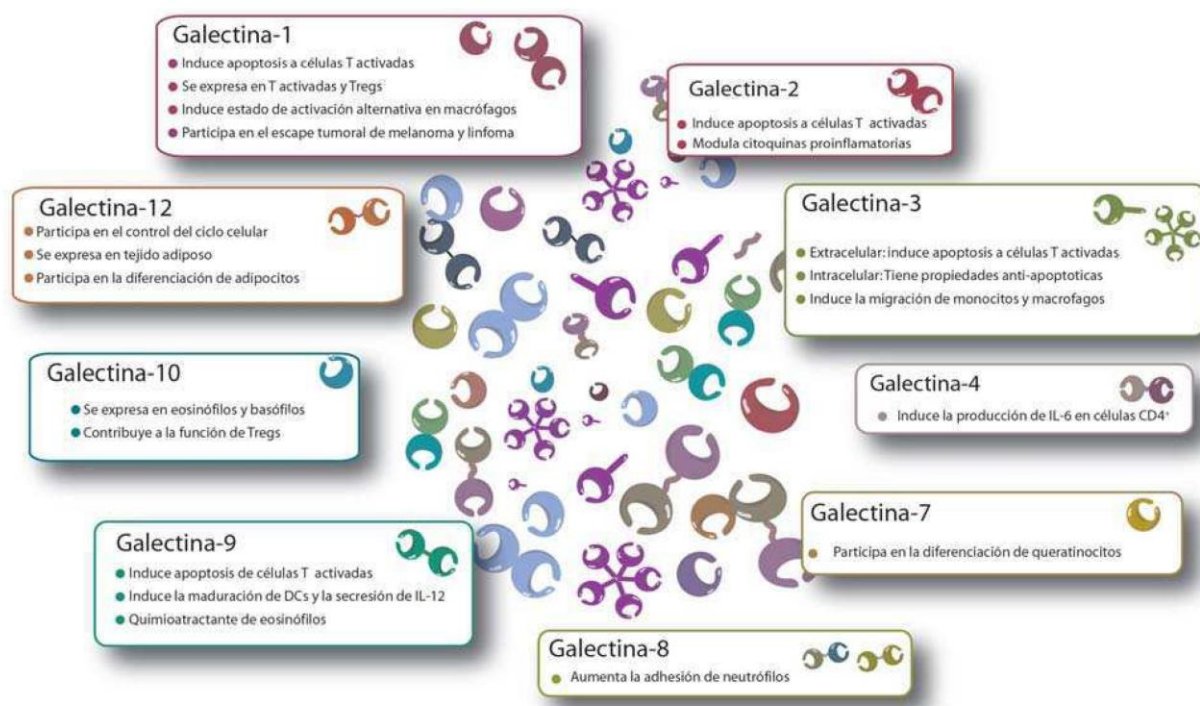
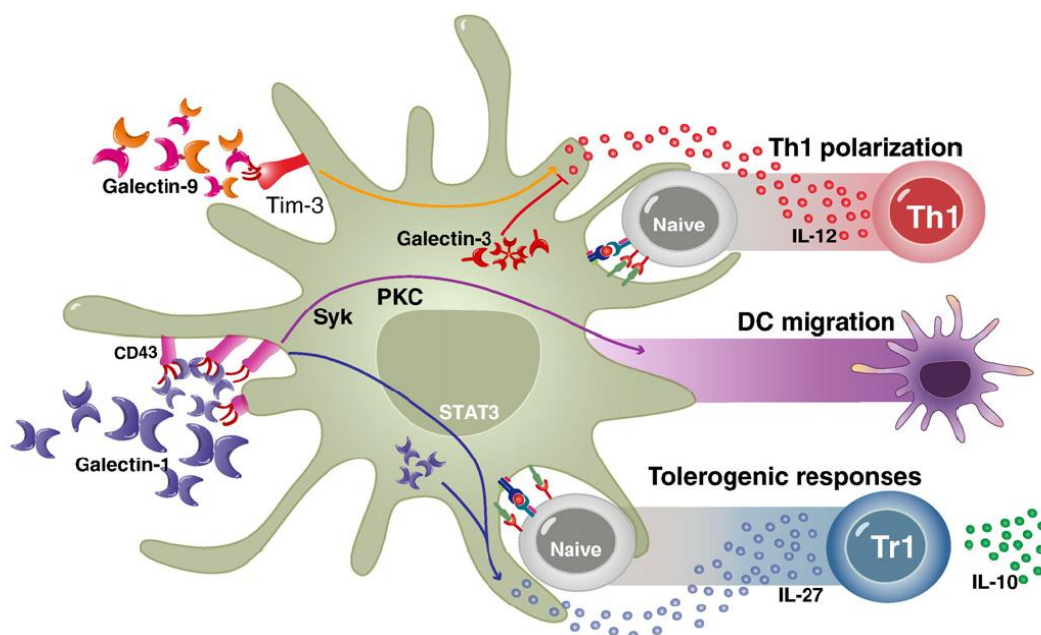


Figura 27: Efectos de diversas galectinas sobre la regulación del ciclo celular, la diferenciación y la apoptosis.

Durante los últimos años, numerosos trabajos tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado que las gal, en especial la **gal-1**, la **gal-3** y la **gal-9** son fundamentales en la regulación de la respuesta inmune [187] [188]. Estas acciones están mediadas, en parte, por la modulación en las cascadas de señalización de las DCs (Fig.28).

La **gal-1** y la **gal-9** se han propuesto como **reguladores negativos** de la respuesta inmunológica. Ambas gal inducen **apoptosis de LT activados**, suprimen la expresión de determinadas citoquinas inflamatorias e influyen en la generación y función de los linfocitos Treg; también parecen favorecer el balance hacia una **respuesta Th2**. Su eficacia inmunosupresora se ha demostrado mediante su aplicación exógena en diferentes modelos animales de enfermedades inflamatorias. Por su parte, la función de la **gal-3 parece ser más compleja**, interviniendo como molécula reguladora que actúa en estadios diferentes de la respuesta inflamatoria. La mayoría de los datos *in vivo* sugieren que durante la **inflamación aguda, la gal-3 tiene principalmente un papel proinflamatorio, mientras que en la fase crónica se asocia a fibrogénesis**. De hecho, se ha comprobado que tiene una función crítica en la activación de los miofibroblastos en el hígado y que contribuye a la fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono [189].



**Figura 28: Modulación de la señalización y función de las DCs por las galectinas.** Las gal modulan una gran variedad de vías de señalización que desencadenan la maduración, inmunogenicidad y migración de las DCs. Mientras que la gal-1 activa una cascada de acciones inhibitorias dirigidas a la amplificación de un circuito tolerogénico mediado por IL-27 e IL-10, también promueve la maduración y migración de las DCs mediante mecanismos mediados por el glico-receptor CD43. La gal-3 endógena inhibe la producción de IL-12, mientras que la gal-9 induce la maduración de las DCs y la polarización a expresión de citoquinas Th1 mediante la unión a Tim-3. Extraído de [179]

El estudio de las **gal en pacientes con psoriasis** ha sido muy escaso hasta el momento. Lacina L. y colaboradores [190], investigaron la expresión de gal-1, -3 y -7 en piel psoriásica comparándola con piel sana mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Uno de los hallazgos más interesantes de este estudio consistió en la intensa **expresión de gal-3 en los capilares de la dermis psoriásica**, lo cual presupone la activación del endotelio en esta enfermedad.

### 3.6.2 GALECTINA 1


La gal-1 fue la primera gal que se describió y se encuentra ampliamente expresada en los tejidos de múltiples organismos vertebrados e invertebrados. Tras su secreción, la gal-1 requiere una rápida unión a sus ligandos extracelulares a fin de mantener su estabilidad [191].

Entre las funciones de la gal-1 destacan la participación en procesos tan variados como la **apoptosis, la renovación celular, la adhesión celular, el desarrollo de linfocitos T y B,**



la inmunorregulación, el cáncer, o la angiogénesis, como se resume en la Tabla 5 y en la Fig.29.

Tabla 5: Principales funciones de la galectina 1

GALECTINA 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Induce apoptosis de los linfocitos T</li> <li>-Inhibe la secreción de citoquinas proinflamatorias</li> <li>-Suprime selectivamente las respuestas Th1 y Th17</li> <li>-Favorece la diferenciación hacia células plasmáticas</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Suprime la inflamación aguda</li> <li>-Inhibe la degranulación de mastocitos</li> <li>-Promueve la migración de las células dendríticas</li> <li>-Contribuye a la activación alternativa de los macrófagos</li> </ul>

Durante el desarrollo de la respuesta inmune innata, se ha demostrado que la gal-1 contribuye a la resolución de la inflamación aguda. En este sentido, la **gal-1 inhibe el reclutamiento y la degranulación de mastocitos y eosinófilos** [192]. En los neutrófilos, la gal-1 bloquea el reclutamiento al sitio de la inflamación [193] [194] [195]. Sin embargo, un estudio reciente indica que la gal-1 es capaz de inducir la migración de los neutrófilos tanto *in vitro* como *in vivo*. Es posible que la gal-1 pueda actuar, según las circunstancias, como quimiotrayente o como molécula que regula negativamente la migración de los neutrófilos en condiciones inflamatorias agudas [196].

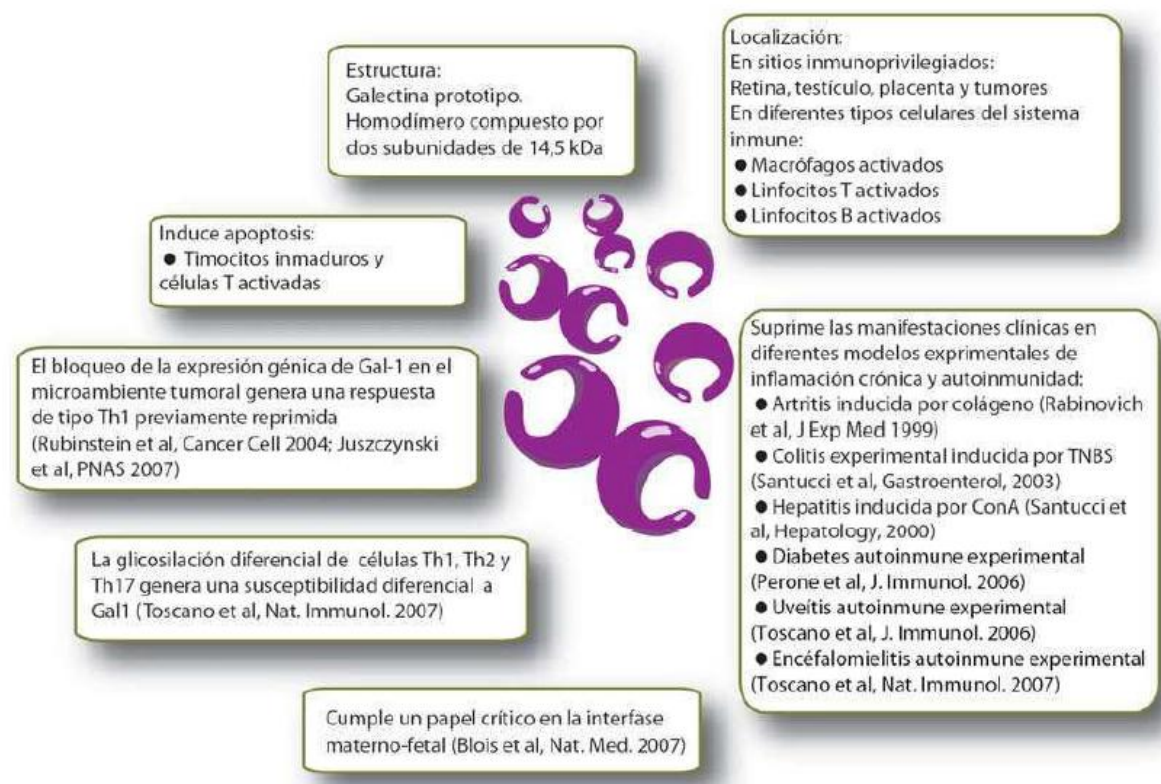
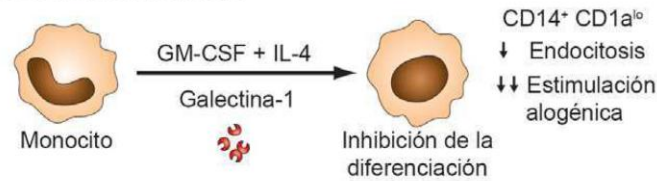


Figura 29: Propiedades inmunosupresoras de la gal 1.

En particular, la **gal-1** ha sido implicada en la **regulación de la maduración, migración y activación de los LT**. Se ha demostrado que esta proteína inhibe la proliferación y expansión clonal de los LT activados, mediante mecanismos que involucran el bloqueo de la activación celular [197] y del ciclo celular [198] o la inducción de apoptosis [199] [200]. Un estudio en un modelo de ratón demostró que la gal-1 induce apoptosis selectivamente en las células proinflamatorias Th1 y Th17, pero no en las células Th2, ni en los linfocitos T naïve o en los LTreg [95]. La **inducción de apoptosis de linfocitos T activados es uno de los principales mecanismos inmunorreguladores de la gal-1**, pero se ha observado que, a bajas concentraciones posee propiedades inmunosupresoras independientes de su efecto proapoptótico como es la **inducción de la síntesis de IL-10** [201]. Además, se ha descrito que los linfocitos Treg expresan niveles superiores de la gal-1 en comparación con los LT efectoras en ensayos *in vitro*, por lo que la gal-1 podría ser un posible mediador en la función inmunosupresora en estas células [202]. Los macrófagos activados producen niveles considerables de gal-1, la cual regula el balance entre el estado proinflamatorio y antiinflamatorio en estas células.

Existen múltiples ejemplos de la **eficacia inmunosupresora de la administración de la gal-1**. En 1990, Offner y colaboradores consiguieron prevenir las formas más leves de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) en ratas tratadas con **gal-1 recombinante** (gal-1r) [203]. Años más tarde, Rabinovich y colaboradores demostraron, en un modelo de ratón de AIC (artritis inducida por colágeno) tratados con gal-1r, un cambio de la respuesta Th1 (característica de la AIC) hacia una respuesta Th2 [204]. El tratamiento con gal-1r ha demostrado su eficacia en otros modelos inflamatorios como la **hepatitis inducida por concanavalina-A** [205], la **colitis** [206], y la **uveítis autoinmune experimental** [207]. Además, se ha demostrado que el tratamiento retrasa la aparición de diabetes tipo 1 en un modelo murino a través de la inducción de altos niveles de IL-10 [208]. Rabinovich, Iñarregui y colaboradores, pertenecen a los grupos que más han publicado en torno a las gal en general y, de éstas en las células dendríticas, en particular. Algunos de los resultados de sus estudios, muestran que la **gal-1 inhibe la diferenciación de monocitos a DCs inmaduras** (Fig.30A). De esta forma, dicha lectina inhibe la generación, a partir de monocitos, de las denominadas “DCs inflamatorias”, un proceso que se desarrolla como consecuencia de la inflamación o de estímulos microbianos [209]. A su vez, **durante la maduración, la gal-1 genera DCs con propiedades tolerogénicas, las cuales promueven la expansión de células CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> productoras de IL-10** con capacidad de inhibir posteriores estimulaciones antigénicas (Fig.30B).

### A. Diferenciación



### B. Maduración

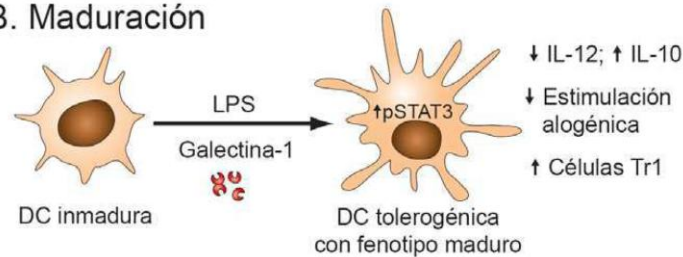


Figura 30: Influencia de la galectina-1 en la diferenciación de los monocitos a células dendríticas (A) y en la maduración de las DCs (B).

En procesos neoplásicos o infecciosos, la inhibición de la expresión de gal-1 o sus glicanos específicos en las DCs, nos permitiría potenciar la respuesta inmune antitumoral o la efectividad de las estrategias de vacunación. Por otro lado, la inducción de DCs con capacidad tolerogénica por estimulación con gal-1 brindaría importantes beneficios terapéuticos en procesos inflamatorios crónicos, enfermedades autoinmunes y en la prevención del rechazo a trasplantes.

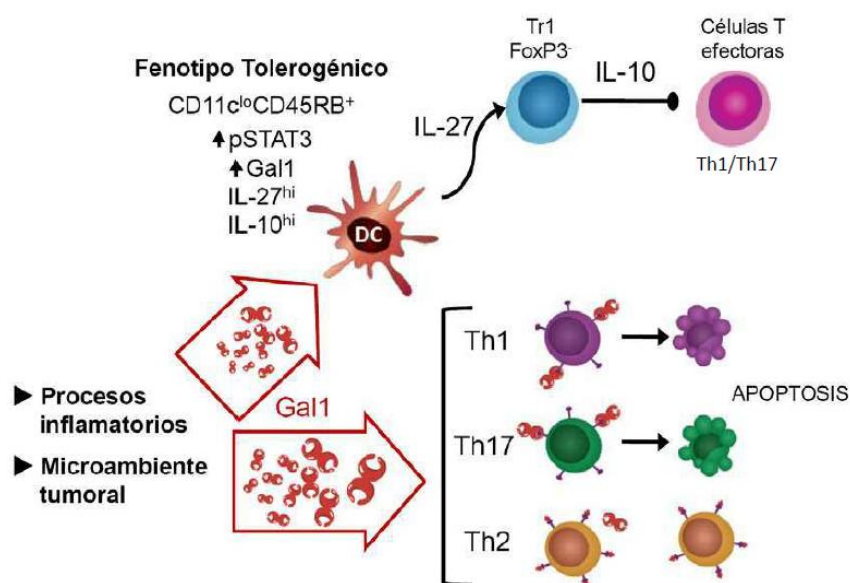


Figura 31: Galectina-1 como nuevo mecanismo de regulación negativa de la respuesta inmune. Modelo hipotético en el cual a través de la iniciación de un circuito inmunorregulatorio, la gal-1 genera DCs tolerogénicas productoras de IL-27, las

cuales favorecen la inducción de LT reguladores productores de IL10 (Tr1), que suprimen la respuesta inflamatoria Th1 y Th17. Frente a un estímulo inflamatorio exacerbado, los niveles de gal-1 endógena aumentarían e inducirían la apoptosis de linfocitos Th1 y Th17, debido a que poseen el repertorio de glicanos específicos para la función proapoptótica de esta proteína. Extraído de [210].

### 3.6.3 GALECTINA 3

La gal-3, estructuralmente tiene la capacidad de formar pentámeros a través las regiones N-terminales de su molécula, permitiendo así la posibilidad de adoptar una unión multivalente a las fracciones glicosiladas de las glicoproteínas de la superficie celular [211] [212]. Esta particular organización sobre la superficie celular, en forma de redes tridimensionales se denominan “**lattices**” de galectinas (Fig.32).



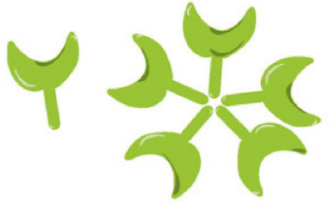
**Figura 32: Formación de “lattices” por la galectina-3.** Esta gal, no sólo tiene la capacidad de formar pentámeros mediante la unión a carbohidratos multivalentes, sino que puede formar estructuras en sábana con glicoconjugados multivalentes de la superficie celular (“lattices”). Modificado de [213].

La gal-3 se expresa en prácticamente todos los tipos de células inmunes e inflamatorias [214] y está involucrada en diversos procesos que ocurren durante la inflamación aguda incluyendo la **activación de los neutrófilos, la adhesión y quimioatracción de monocitos/macrófagos, la opsonización de neutrófilos apoptóticos y la activación de mastocitos** [215] [216]. La gal-3 participa además, en la **inflamación crónica mediante la activación y proliferación de los fibroblastos** [217]. Por otra parte, la gal-3 también está altamente expresada en células epiteliales, incluidos los queratinocitos.



La gal-3 se ha detectado sobre la superficie de eosinófilos, neutrófilos, mastocitos, células dendríticas, macrófagos y linfocitos T y B, siendo los **macrófagos una de las principales fuentes de gal-3 extracelular**. A través de su interacción con la IgE y FcεRI, la gal-3 es capaz de inducir la liberación de mediadores inflamatorios tanto de mastocitos como de eosinófilos. Por otro lado, la gal-3 *in vitro*, inhibe la expresión de la IL-5 en diferentes tipos celulares como los eosinófilos o los linfocitos T [218] a través de su unión al receptor de IgG de baja afinidad (CD32) [219]. En la Tabla 6 se resumen las principales funciones de la gal-3.

Tabla 6: Funciones principales de la galectina 3

<b>GALECTINA 3</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Induce la apoptosis de linfocitos T (extracelular)</li> <li>-Protege a los linfocitos T de la apoptosis (intracelular)</li> <li>-Promueve la secreción de citoquinas proinflamatorias</li> <li>-Favorece la respuesta Th2 (extracelular)</li> <li>-Favorece la respuesta Th1 (intracelular)</li> <li>-Favorece la diferenciación hacia linfocitos B memoria</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Promueve la inflamación aguda</li> <li>-Potencia la migración de los eosinófilos</li> <li>-Promueve la trans migración y degranulación de los neutrófilos</li> <li>-Favorece la degranulación de los mastocitos</li> <li>-Inhibe la producción de la IL-12 de las células dendríticas</li> <li>-Media la activación alternativa de los macrófagos</li> </ul>

**Extracelularmente, la gal-3 induce apoptosis** de los linfocitos T activados y otras líneas celulares con importantes funciones en la respuesta inflamatoria, lo cual puede contribuir al desarrollo de enfermedades autoinmunes [220, 221]. Sin embargo, en el medio **intracelular** protege a las células de la apoptosis y promociona la proliferación de los linfocitos T [222], ya que **suprime vías de apoptosis** [223]. Numerosos estudios han demostrado esta propiedad de protección de la gal-3 frente a la apoptosis. Por ejemplo, las células transfectadas que expresan gal-3 proliferan más rápido que las células transfectadas control, o la sobreexpresión de la gal-3 protege a los LT de toxinas que inducen la apoptosis [224].

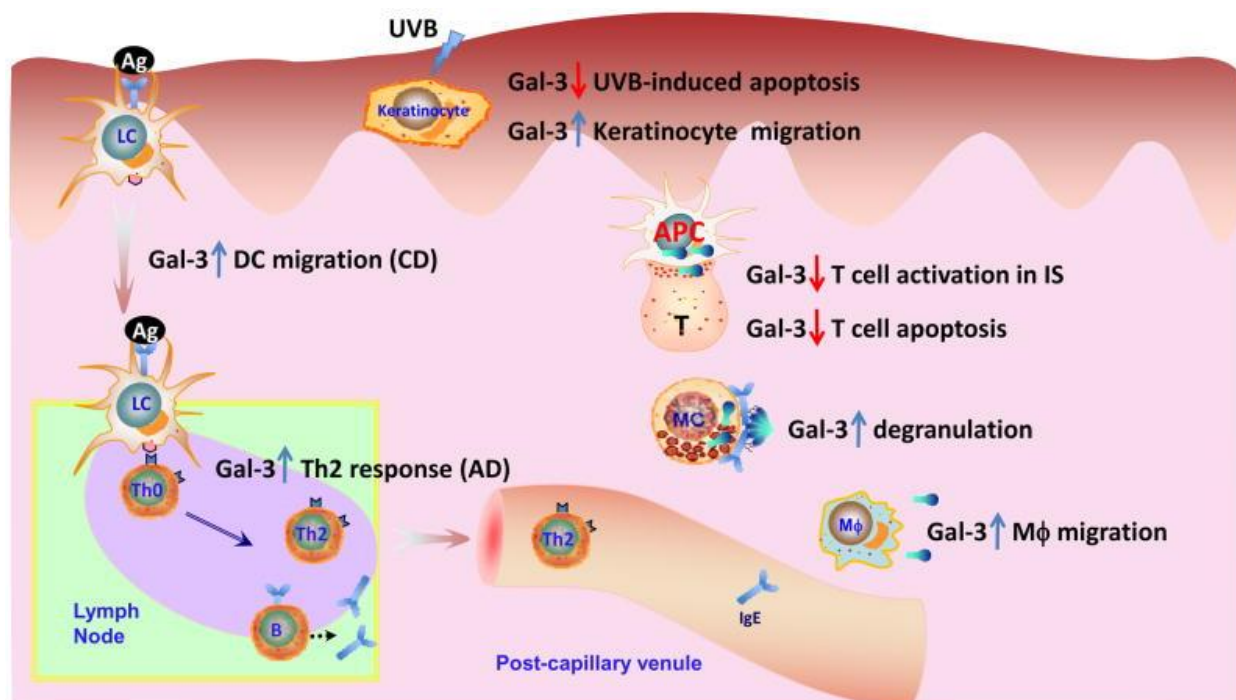
A diferencia de la gal-1, la **gal-3 se postula como molécula proinflamatoria** tanto en el asma como en otras enfermedades como la EAE [225], la hepatitis producida por concanavalina A [205], la diabetes inducida por estreptozotocina [208] o el melanoma metastático. Los mecanismos involucrados en esta acción proinflamatoria son, entre otros,



la **prevención de la apoptosis de las células, el aumento de la IL-17, la síntesis de IFN- $\gamma$  y la disminución de la IL-10** [226].

En la piel, la gal-3 se expresa en los KCs, folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas [227], así como en otras células residentes en la epidermis y dermis (melanocitos, DCs, fibroblastos y monocitos).

Se ha demostrado por inmunofluorescencia e inmunohistoquímica que la gal-3 se encuentra abundantemente en los **KCs normales con un refuerzo perinuclear**. La **gal-3** está involucrada en la **patogenia de enfermedades inflamatorias de la piel** a través de la afectación de las funciones de las células del sistema inmunológico [183, 213, 228], ver Fig.33. La gal-3 contribuye al desarrollo de la **dermatitis atópica** porque a través de sus acciones sobre las DCs y los linfocitos T, estimula la polarización hacia una **respuesta Th2** [229]. Además, la gal-3 podría estar implicada en el desarrollo de **hipersensibilidad de contacto** al regular la capacidad de migración de las CPAs; de hecho, una de las proteínas que se suprime en los KCs tras la exposición al níquel es la gal-3 [230]. Se han descrito importantes funciones de la gal-3 en el crecimiento tumoral, apoptosis, motilidad celular, invasión y metástasis. De esta manera, **en la piel, la gal-3** podría actuar como reguladora del **desarrollo y progresión tumoral** a través de varias vías de señalización, tales como la **inhibición de la apoptosis de los KCs**. La gal-3 se detecta en diferentes estadios del desarrollo del **melanoma**; en general se describe que la **expresión de la gal-3 en células de melanoma y nevus está incrementada en comparación con melanocitos normales** [231]. No obstante, aún es tema de debate el nivel de expresión en los distintos estadios del tumor. En contraposición, se aprecia una marcada disminución de la expresión de gal-3 en el **cáncer de piel no melanoma** y su expresión parece estar relacionada con el grado de maduración celular [232].



**Figura 33: Función de la gal-3 en las enfermedades inflamatorias de la piel.** La gal-3 puede afectar a un amplio rango de respuestas inflamatorias de la piel mediante la regulación de las funciones de células epiteliales y del sistema inmunológico, tanto por mecanismos extra como intracelulares. La apoptosis de los KCs es un mecanismo de control muy importante en el mantenimiento de la homeostasis epidérmica y es inhibida por la gal-3. La gal-3 contribuye a la fagocitosis y quimiotaxis de las DCs y los macrófagos (Mφ). Además, la gal endógena, regula negativamente la transducción de señal mediada por el receptor de células T (TCR) en los LT, y también protege a los LT de la apoptosis. La gal-3 endógena y exógena promueven la activación y degranulación de los mastocitos. Más aún, la gal-3 conduce a la polarización de una respuesta Th-2 y promueve la inflamación alérgica de la piel mediante su control de DCs y linfocitos T. CD: dermatitis de contacto; AD: dermatitis atópica; Ag: antígeno; LC: célula de Langerhans; MC: mastocito; APC: célula presentadora de antígeno. Extraído de [213].

### 3.6.4 GALECTINA 9


La gal-9 se identificó por primera vez en la década de los noventa como **quimioatrayente y factor de activación de los eosinófilos producida por linfocitos T** [233, 234] [235] [236]. Posteriormente, se ha descrito su participación como factor de activación distintos procesos biológicos tales como la **adhesión, agregación y muerte celular** como se resume en la Tabla 7. La gal-9 está ampliamente distribuida en el organismo y se ha detectado en el hígado, intestino delgado, timo, riñón, bazo, pulmón, músculo cardíaco y esquelético, reticulocitos y cerebro [237].

La gal-9 favorece la iniciación de la respuesta inmune adaptativa. Se ha descrito que la **gal-9 estimula la maduración de las DCs**. De hecho, las DCs maduras por gal-9 secretan **IL-12 pero no IL-10**, y estimulan a los linfocitos alogénicos TCD4+ hacia un perfil de **citocinas Th1** (IFN-gamma e IL-2) en lugar de Th2 (IL-4 e IL-5) [238]. Estos hallazgos de la

participación de la gal-9 en la iniciación de la respuesta inmunológica mediante su acción sobre las DCs es congruente con una publicación en la que el **receptor de gal-9, Tim-3** se expresa en células de la inmunidad innata y promueve la inflamación de los tejidos [239]. La **molécula Tim-3** pertenece a la familia de las inmunoglobulinas y **se expresa en los LTh1**, produciendo la muerte celular en estos linfocitos (y no en los LTh2) [240]. Al bloquear o activar la señal Gal-9/Tim-3 se ha comprobado la progresión de múltiples enfermedades autoinmunes, como la diabetes tipo1 [241], la artritis autoinmune [242], la esclerosis múltiple [243], la encefalomiелitis autoinmune [240], las enfermedades alérgicas [244] [245] o el rechazo a transplantes [246].

La gal-9, además de la respuesta Th1, regula la respuesta Th17, **inhibiendo a los linfocitos Th17, mientras que aumenta los linfocitos Treg-FoxP3** [242]. Existen múltiples modelos animales de enfermedades como la EAE [247] o la AIC [242] donde la administración de la gal-9 inhibe el desarrollo de los linfocitos Th17 e induce la diferenciación de los LT naïve a LT reg, contrarrestando así la respuesta inflamatoria de la enfermedad. Debido a su potente intervención en la supresión de los LT y en la inducción de tolerancia, la **gal-9 se ha considerado como un posible candidato terapéutico para el tratamiento de enfermedades autoinmunes**.

Tabla 7: Principales funciones de la galectina 9

<p><b>GALECTINA 9</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Promueve la muerte celular de los linfocitos T activados</li> <li>-Inhibe el desarrollo de los linfocitos Th17</li> <li>-Induce la apoptosis de los linfocitos Th1, a través de su interacción con Tim-3</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Modula la inflamación alérgica aguda</li> <li>-Promueve la maduración de las células dendríticas y la secreción de IL-12</li> <li>-Promueve la inflamación, a través de su interacción con Tim-3 en los macrófagos</li> </ul>

#### 4. OBJETIVOS GENERALES DEL ESTUDIO

1. Identificar los genes expresados diferencialmente (tanto inducidos como inhibidos) en células dendríticas en respuesta a la radiación ultravioleta, prestando especial atención a aquellos genes potencialmente implicados en la regulación de la respuesta inmune.
2. Analizar la expresión de galectinas en células dendríticas de pacientes con psoriasis en muestras de piel (lesional y no lesional) y sangre periférica, comparando los resultados con los obtenidos en controles sanos.

## 5. ESTUDIO 1: IDENTIFICACIÓN DE GENES EN RESPUESTA A RADIACIÓN ULTRAVIOLETA EN CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONOCITOS HUMANOS

### 5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

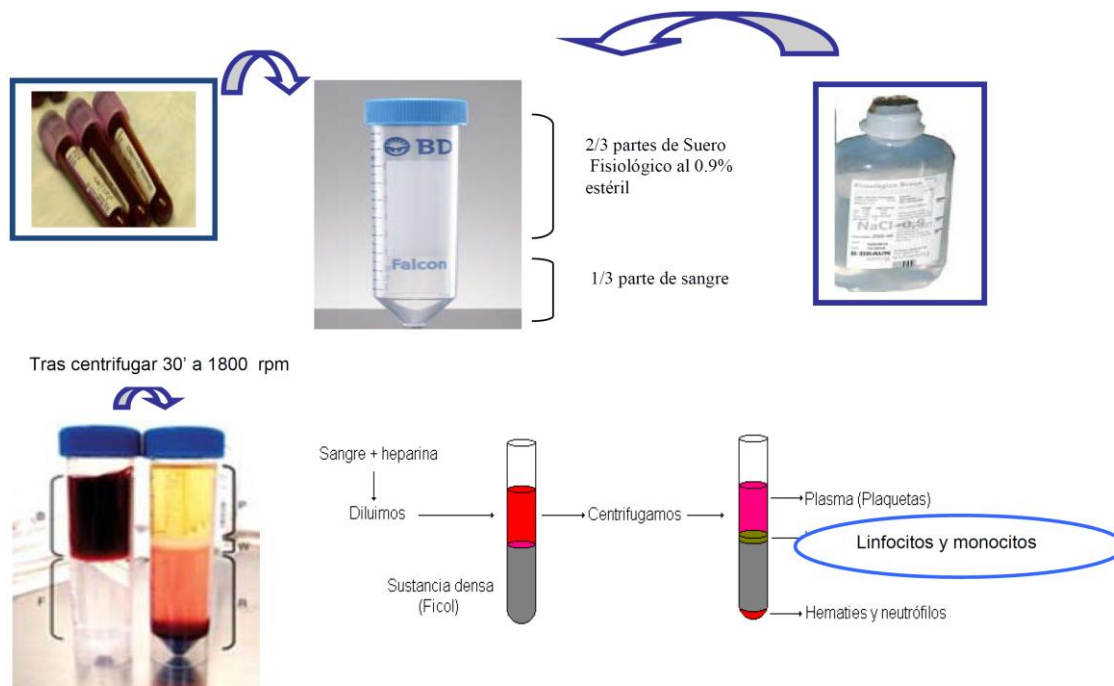
1. Analizar los cambios en la expresión génica en células dendríticas humanas derivadas de monocitos de sangre periférica en respuesta a la radiación ultravioleta.
2. Identificar aquellos genes asociados a la regulación de la respuesta inmune que resulten modulados por la radiación ultravioleta.
3. Comparar los cambios en la expresión génica de las células dendríticas con los queratinocitos y melanocitos.

### 5.2 MATERIAL Y MÉTODOS

Nuestro estudio se realizó de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité Ético local del Hospital Universitario de La Princesa.

#### 5.2.1 Obtención de células dendríticas derivadas de monocitos, queratinocitos y melanocitos

Las **células mononucleares de sangre periférica** (PBMC, de su traducción al inglés) se aislaron a partir de la sangre venosa de donantes sanos (sobrantes de banco de sangre) mediante **separación por gradiente** de densidad con *Lymphoprep* (Nycomed, Oslo, Noruega) de acuerdo con los procedimientos estandarizados (ver Fig.34). Los monocitos se purificaron a partir de las PBMC por un paso de adherencia de 30 minutos a 37°C en medio de cultivo RPMI (Fig.35) suplementado al 10% con suero bovino fetal (FCS, de su traducción al inglés). Las células no adheridas fueron desechadas y los monocitos adheridos fueron inmediatamente sometidos al protocolo de **diferenciación a DCs** como está descrito por Sallusto et al [248]. Brevemente, los monocitos se cultivaron durante 6 días en medio RPMI con 10% de FCS en presencia de **IL-4** (10ng/ml, R&D Systems Inc, Minneapolis, MN EEUU) y **GM-CSF** (200 ng/ml, Schering-Plough, Madrid, España). Las características fenotípicas de estas células fueron **evaluadas por citometría de flujo en el día +6 (HLA-DR+, CD1a+, CD209+, CD14-)**.



**Figura 34: Protocolo de separación de las células mononucleares en sangre periférica por gradiente de densidad con Ficoll.**



**Figura 35: Medio RPMI 1640.** Medio de cultivo celular compuesto por una mezcla de sales enriquecida con aminoácidos y otros componentes esenciales para el crecimiento celular.

Los **queratinocitos humanos** se obtuvieron de piel normal (prepucios, piel de abdomen o de cuero cabelludo) como se describe en [249]. Para explicarlo brevemente, se incubaron finas láminas de piel durante toda la noche a 4°C con **dispasa** (2mg/ml) [43] en **PBS** (solución tamponada con fosfato), para permitir la separación entre epidermis y dermis. Para obtener las células individuales, la epidermis fue tratada con **tripsina al 0,25%** durante 20 minutos. Las células epidérmicas se cultivaron en medio específico para queratinocitos



(Defined keratinocyte-SFM, Gibco). El medio de cultivo fue reemplazado cada 2 días. Los melanocitos humanos se obtuvieron a partir de la epidermis de prepucios y cultivados en Medio 254CF para melanocitos (Cascade Biologics, Portland, OR EEUU) como se describe [250]. Los **cultivos de queratinocitos y melanocitos humanos que se emplearon tenían hasta un máximo de 4 pases, y los experimentos se llevaron a cabo con cultivos de un 60-80% de confluencia** (Fig.36).

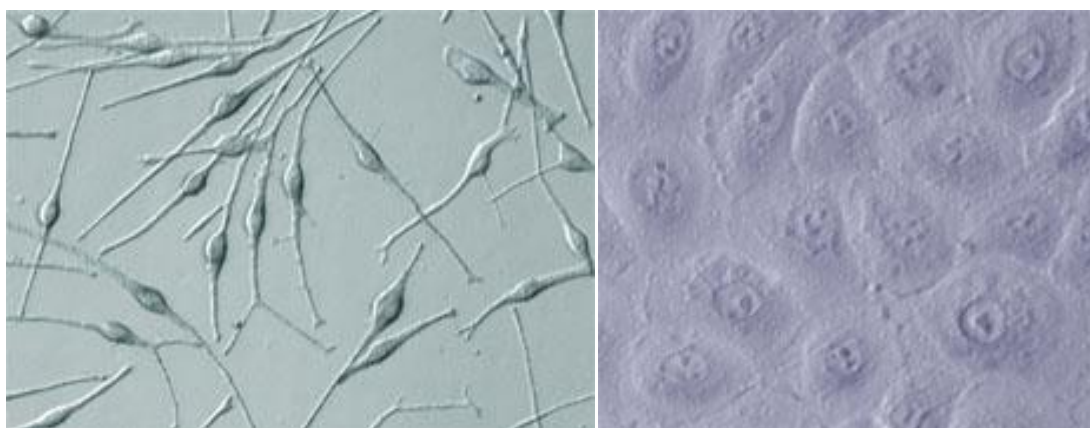


Figura 36: Cultivos primarios de melanocitos (A) y queratinocitos (B).

### 5.2.2 Radiación de las muestras obtenidas con luz ultravioleta (UVA+UVB) con simulador solar

Se empleó un **simulador solar con arco de xenon de 1000 watt** (Oriel, EEUU) equipado con un filtro Oriel 81017 ("Colipa"). Para controlar que las condiciones de irradiancia fuesen idénticas en todos los experimentos, se realizaron mediciones de irradiancia a diario empleando un radiómetro IL-1700 (International Light, USA) equipado con fotodetectores SED240/UVB-1/TD y SED033/UVA/TD. El radiómetro fue calibrado con un espectrorradiómetro Solar-Scope (Solatell, Reino Unido).

Las DCs, KCs y MCs humanos ( $3 \times 10^6$  en 0,75 ml de solución salina balanceada Hanks) fueron radiados con  **$3,7 \text{ J/cm}^2$  UVA+  $0,3 \text{ J/cm}^2$  UVB** (Fig.37). Inmediatamente después de la irradiación, las células fueron cultivadas durante 6 horas en RPMI, 10% FCS conteniendo IL-4 (10ng/ml) y GM-CSF (500U/ml), y subsiguientemente procesados para la extracción de ARN. Se empleó esta dosis de irradiación porque estudios previos habían demostrado que esta dosis no causa un porcentaje significativo de hipodiploidía pero induce la secreción de TNF-alfa y modifica la expresión de varios receptores de superficie de las DCs [251].

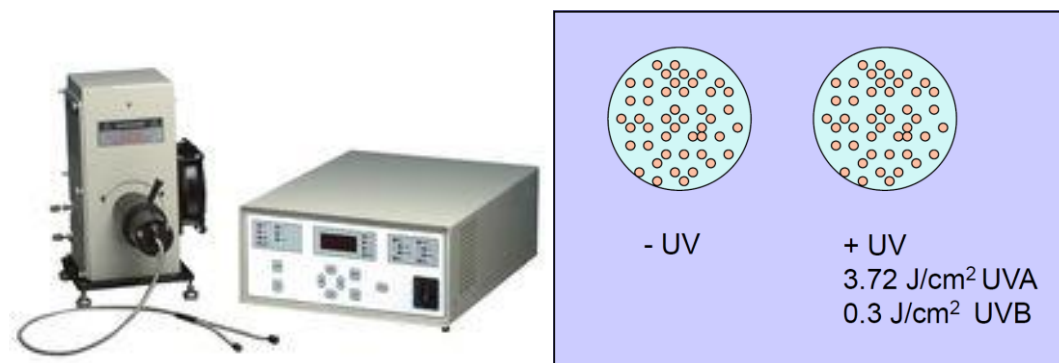


Figura 37: Simulador solar Oriel y condiciones de exposición de nuestras células (MCs, KCs y DCs).

### 5.2.3 Extracción del ARN total de muestras radiadas y no radiadas

El ARN total fue extraído con RNeasy Mini Kits (Qiagen), como se muestra en la Fig.38.



Figura 38: Protocolo de extracción del ARN.

### 5.2.4 Hibridación del ARN en los microarray y detección de la señal con escáner

El ARN total de cada muestra fue etiquetado, procesado e independientemente hibridado en un **bioarray del genoma humano completo CodeLink** (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) que permite el análisis de **55.000** genes humanos. Las hibridaciones se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras de

cada placa fueron **escaneadas con un Array Scanner Gene-Pix** y la imagen fue procesada empleando el **programa de análisis de expresión CodeLink** (Fig.39).



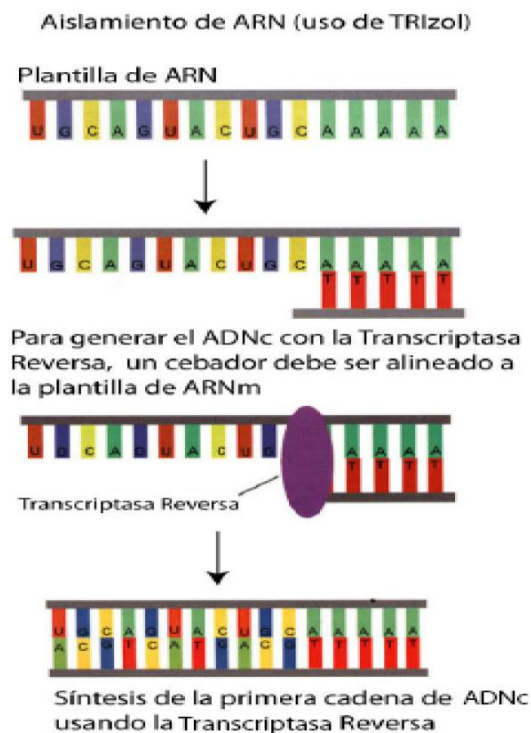
Figura 39: Placa de bioarray del genoma humano completo y escáner Gene-Pix.

### 5.2.5 RT-PCR

Los cambios de los genes que resultaron regulados por la RUV de acuerdo a los resultados obtenidos de los microarrays, fueron validados por **PCR a tiempo real semi-cuantitativa con sondas Taq-Man** (Universal Human Probe Roche library). La **reacción en cadena de la polimerasa**, cuyas iniciales en inglés son PCR (*polymerase chain reaction*), es una técnica que fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Esta técnica ha revolucionado el campo de la biología molecular por sus importantes características de sensibilidad, especificidad, eficiencia, mínimo riesgo de contaminación y relativa sencillez de uso. Asimismo, la PCR ha puesto al alcance de cualquier laboratorio de investigación y diagnóstico, la capacidad de realizar ensayos moleculares.

La esencia de la **PCR cuantitativa** es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación de nuestro gen de interés. Con este método se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Como su nombre indica, se basa en la actividad de una enzima, la **ADN polimerasa**, que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio, como materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de

adenina, timina, citosina y guanina) y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (el cebador, o en inglés *primer*). Para ello, se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse las hebras de ADN para que vuelvan a ser duplicadas (Figs.40 y 41).



**Figura 40: Retrotranscripción inversa o reversa.** Extracción de ARN y síntesis de la primera cadena de ADN complementario.

Para realizar la técnica de PCR se necesitan fundamentalmente los siguientes elementos:

- Los **4 desoxirribonucleósidos-trifosfato (dNTP)**, sustratos para polimerizar nuevo ADN.
- **Dos cebadores o iniciadores**, oligonucleótidos que son, cada uno, complementarios a una de las dos hebras del ADN. Son secuencias cortas, de entre 6-40 nucleótidos (normalmente de 18 a 22) que permiten que la polimerasa inicie la reacción. Deben estar situados enfrentados y a no mucha distancia, delimitando la zona de ADN a amplificar.
- Un **espectrofotómetro** (Nano-drop, Wilmington, USA) para medir la cantidad de ARN de cada muestra, siendo posible, además, determinar con precisión la pureza y la concentración inicial del ARN (Fig. 42A).

- **ADN polimerasa** o mezcla de distintas polimerasas con temperatura óptima alrededor de 70 °C (la más común es la polimerasa Tag).
- **ADN molde**, que contiene la región de ADN que se va a amplificar.
- **Termociclador** (también conocido como máquina de PCR o reciclador térmico de PCR) el aparato que va a mantener la temperatura necesaria en cada una de las etapas que conforman un ciclo (Fig. 42B).

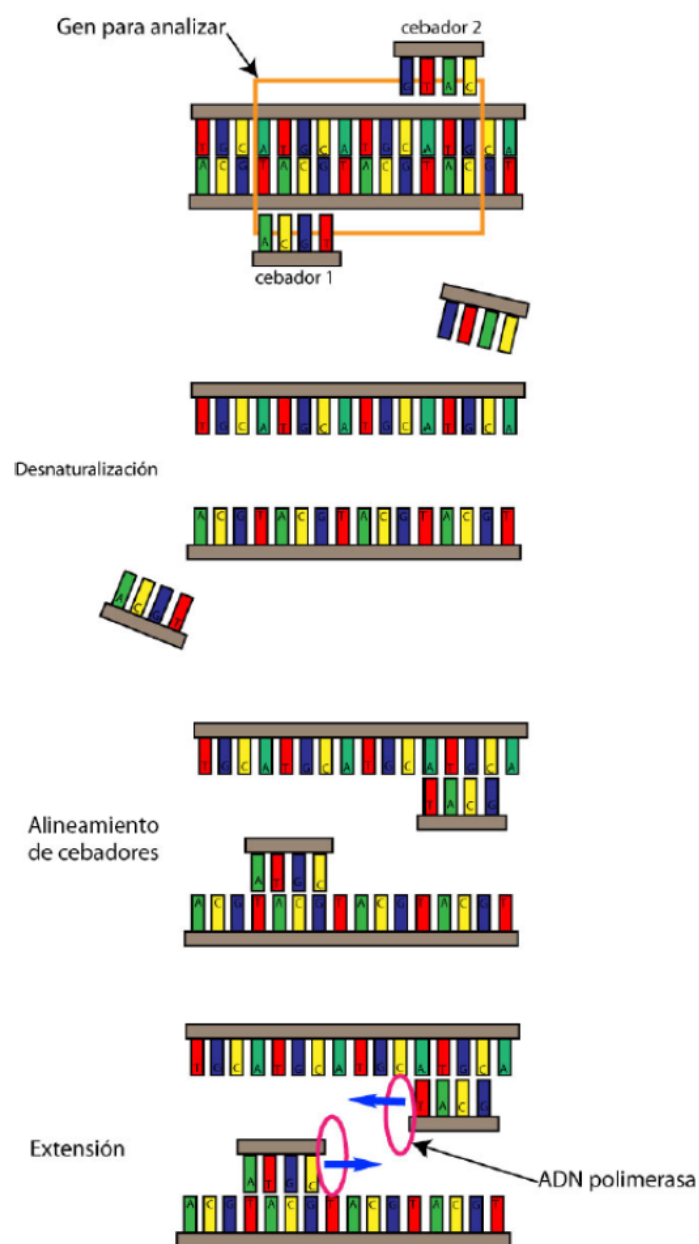


Figura 41: Procedimiento de la PCR.





A



B

Figura 42: Espectrofotómetro o nanodrop (A) y termociclador (B).

### 5.2.6 Western blot

La **transferencia de proteínas o blotting** supone la inmovilización de las proteínas (o ácidos nucleicos) sobre membranas sintéticas, seguido de la detección empleando sistemas especialmente diseñados para la tinción de *blots*. El método para la detección de proteínas más potente es el denominado **Western blot** en el que las **proteínas son separadas en primer lugar mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y posteriormente se transfieren a una membrana, mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel (*electroblotting*)**. Una vez completada esta operación, la/s proteínas de interés son reveladas por el agregado de un anticuerpo específico. El nombre Western (oeste, occidental) le fue dado por el investigador W. Neal Burnette [252] como un juego de palabras por los nombres *Southern* y *Northern* de las técnicas que se usan con el mismo fin pero que son aplicadas a los ácidos nucleicos. Después de que Edwin Southern diseñara la técnica que lleva su nombre para detectar ADN, por oposición se denominó Northern a la técnica aplicada al ARN. Finalmente como una broma, la técnica de *immunoblotting* (inmunotransferencia) para proteínas fue denominada Western. El *electroblotting* es el método donde las proteínas son transferidas desde el gel a la membrana electroforéticamente. La ventaja de este proceso es su corta duración (de 30 minutos a pocas horas), lo que reduce notablemente el efecto de difusión de las bandas. El procedimiento se inicia apilando sucesivamente sobre una esponja plana papel de filtro empapado en buffer de transferencia, el gel, la membrana en contacto directo



con el gel, papel de filtro y finalmente una esponja plana. Este conjunto se recoge entre dos capas de plástico perforado y se introduce en una cuba en la que se encuentra una solución salina (buffer de transferencia) y dos electrodos planos (diseñados para conseguir un campo uniforme en toda la superficie del gel). Se dispone de forma que el gel quede hacia el ánodo (-) y la membrana hacia el cátodo (+) (Fig. 43). Una vez realizada la transferencia, la membrana se puede analizar inmediatamente o bien conservarla en frío (2 a 8 °C) durante meses.

En nuestro estudio, tras la radiación UV, las células fueron cultivadas durante 24 horas más tras la radiación y en ese momento lisadas en NP40 1%, deoxicolate 0,5% y SDS 0,1%. Los **extractos proteicos** se cargaron en **geles SDS-PAGE al 12%** (Gal-1, Gal-3, SLA, PTPE, ICOSL, SOCS1 y GADD45a) **y al 8%** (THBS-1). Tras el electroblotting, las membranas de nitrocelulosa se incubaron con los anticuerpos primarios específicos y los correspondientes anticuerpos secundarios.

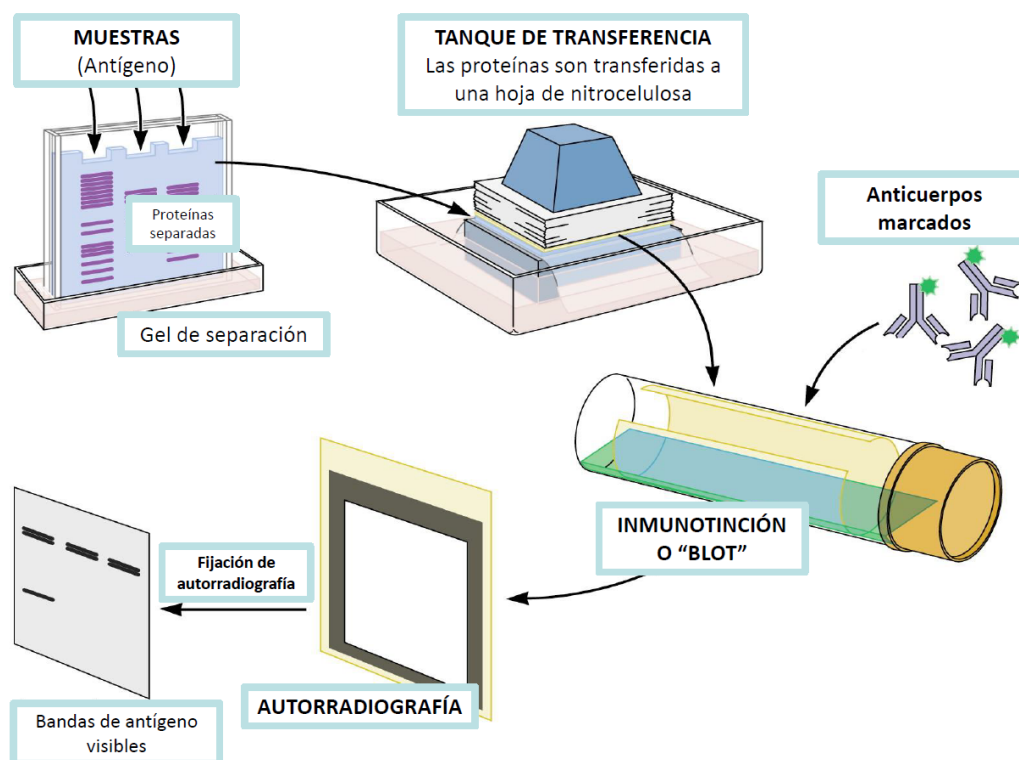


Figura 43: Procedimiento de Western blot.

### 5.2.7 Análisis estadístico

El estudio de estos resultados de los microarrays es tremendamente complejo, ya que se obtienen listados de cientos de datos que habitualmente obligan a recurrir a un experto en Bioestadística que, como en nuestro caso, se encargó del análisis de los mismos.

Brevemente, los datos obtenidos de los microarrays se analizaron de la siguiente manera: los valores de la intensidad de señal obtenidos fueron analizados por el programa del Bioconductor limma (<http://www.bioconductor.org>) y se asignaron a grupos experimentales: **DCs-no radiadas vs DCs radiadas con UV**. Los genes con valores ajustados de **p<0,05** se consideraron como diferencialmente expresados. Posteriormente, los genes fueron **estratificados en grupos funcionales** (definidos por su implicación en metabolismo, apoptosis, diferenciación celular...) empleando bases de datos disponibles para ello (*WEB-based GENE SEt AnaLysis Toolkit -WebGestalt-* <http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>). WebGestalt es la abreviatura de "**WEB-based GENE SEt AnaLysis Toolkit**" [253]. Es una página diseñada para poder realizar estudios funcionales de genómica, proteómica o estudios genéticos a gran escala de los que se generan continuamente un gran número de

listas de genes (por ejemplo, grupos de genes diferencialmente expresados, grupos de genes co-expresados...). La WebGestalt incorpora información de diferentes fuentes públicas y proporciona a los investigadores una forma más fácil de darle sentido o entender las listas de genes que obtienen en sus estudios. En esta página se encuentran numerosas herramientas de **análisis de “enriquecimiento”**, es decir, a partir de nuestra lista de genes podemos obtener otros que estén relacionados o bien, agruparlos por funciones para poder así, ampliar nuestro estudio.

Los resultados obtenidos en las PCRs y WBs se analizaron por la prueba de **ANOVA** para determinar las diferencias entre más de 2 grupos.

En la Fig.44, se expone un **resumen del diseño general del estudio** con las técnicas empleadas.

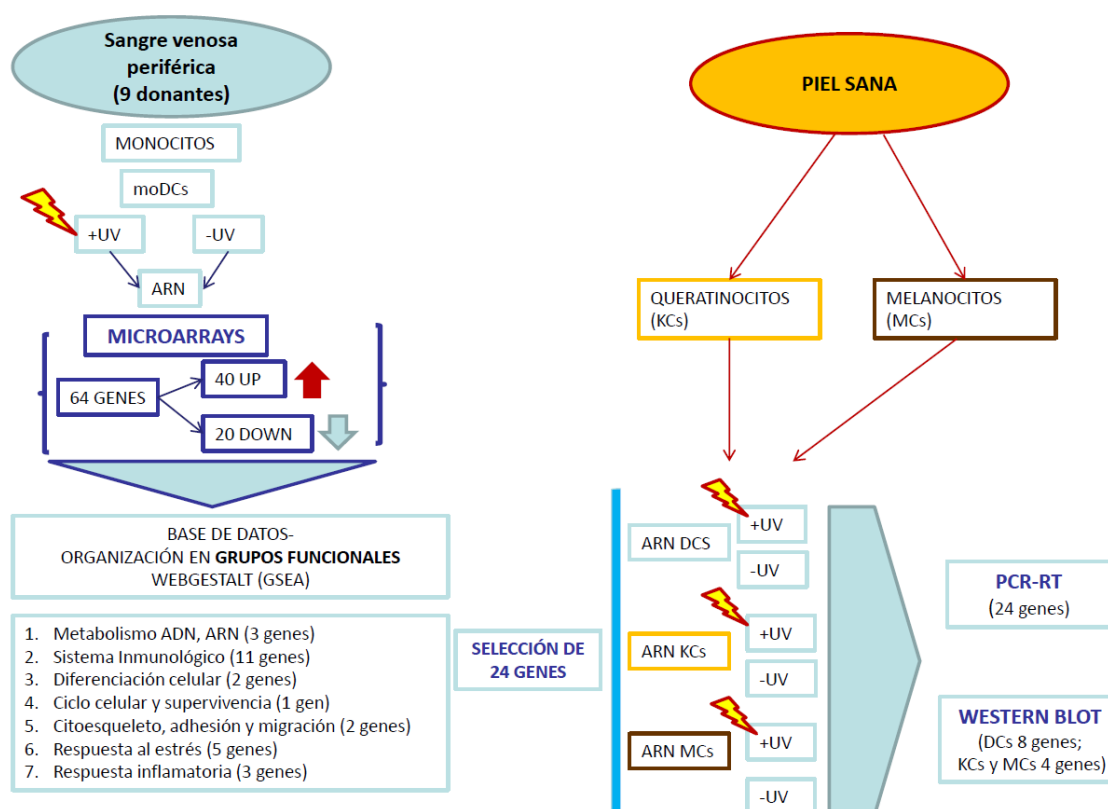


Figura 44: Diseño general del estudio.

## 5.3 RESULTADOS

### 5.3.1 Genes regulados por radiación UV solar simulada en DCs derivadas de monocitos humanos.

Lo primero que hicimos fue analizar mediante microarrays del genoma humano total los cambios en la expresión de genes en respuesta a la RUV.

El análisis estadístico de los valores en la expresión génica de **DCs irradiadas comparadas con no-irradiadas**, puso de manifiesto la **modulación de 64 genes con una  $p < 0.05$** . Entre estos 64 genes, **40 estaban inducidos a más del doble del valor basal** tras la exposición a UVA+UVB, estos genes se enumeran en la Tabla 8. De manera análoga, había **24 genes cuya expresión estaba reducida a la mitad** tras la radiación UVA+UVB y se enumeran en la Tabla 9.

**Tabla 8: Genes inducidos en DCs irradiadas con luz UV comparadas con DCs no irradiadas.** <sup>a</sup> Los valores de cambio se refieren a la expresión de DCs controles no irradiadas.

Gene symbol	Access GenID	Name	<sup>a</sup> Fold change (log 2)
GDF15	9518	Growth differentiation factor 15	5.99
IL1B	3553	Interleukin 1, beta (IL1B)	3.98
FDXR	2232	Ferredoxin reductase	4.06
PLK2	10769	Polo-like kinase 2	4.32
IL1A	3552	Interleukin 1, alpha	3.59
CXCL2	2920	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	3.52
ULK4	54986	Unc-51-like kinase 4	4.14
IFI27	3429	Interferon, alpha-inducible protein 27	3.23
IL8	3576	Interleukin 8	3.18
CDGAP	57514	Cdc42 GTPase-activating protein	3.1
JARID2	3720	Jumonji, AT rich interactive domain 2	3.36
THBS1	7057	Thrombospondin 1	3.26
DIRAS3	9077	DIRAS family, GTP-binding RAS-like 3	3.17
DOT1L	84444	DOT1-like, histone H3 methyltransferase	3.17
PHLDA2	7262	Pleckstrin homology-like domain, family A, member 2	2.71
PCNA	5111	Proliferating cell nuclear antigen	3.16
CD163	9332	CD163 molecule	2.71
FAM135A	57579	Family with sequence similarity 135, member A	2.93
CCL7	6354	Chemokine (C-C motif) ligand 7	2.5
TMEM88	92162	Transmembrane protein 88	2.42
PARP16	54956	Poly (ADP-ribose) polymerase family member 16	3.84
MYO5B	4645	Myosin VB	2.58
CDC42EP3	10602	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3	2.60
NOL7	51406	Nucleolar protein 7, 27kDa	2.38
PCDH12	51294	Protocadherin 12	2.71
HIST1H2BD	3017	Histone cluster 2, H2bd	2.60
RRAD	6236	Ras-related associated	2.49
AICDA	57379	Activation-induced cytidine deaminase	2.25
ETS2	2114	V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2	2.28
JHDM1D	80853	Jumonji C domain containing histone demethylase 1 homolog D	2.27
HIST2H2BE	8349	Histone cluster 2, H2be	2.27
RCP9	27297	Calcitonin gene-related peptide-receptor component protein	2.66
PAQR6	79957	Progestin and adipoQ receptor family member VI	2.17
CCNL1	57018	Cyclin L1	2.09
RAPGEF6	51735	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6	2.13
PMAIP1	5366	Phorbol-12myristate-13-acetate-induced protein 1	2.10
PICALM	8301	Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein	2.44
RBM16	22828	RNA binding motif protein 16	2.38
PSMC2	5701	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 2	2.17
POLH	5429	Polymerase (DNA directed), eta	2.40

**Tabla 9: Genes con expresión reducida en DCs irradiadas con luz UV comparadas con DCs no irradiadas.** <sup>a</sup> Los valores de cambio se refieren a la expresión de DCs controles no irradiadas.

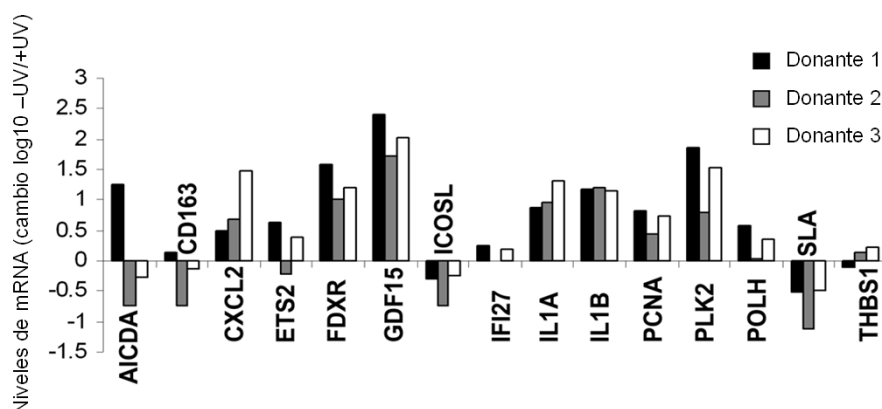
Gene symbol	Access GeneID	Name	<sup>a</sup> Fold change (log 2)
TFEC	22797	Transcription factor EC	-2.11
PPFIBP2	8495	PTPRF interacting protein, protein binding 2	-2.37
LUC7L2	51631	LUC7-like 2 ( <i>S. cerevisiae</i> )	-2.58
IFIT1	3434	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	-2.01
WDR67	93594	WD repeat domain 67	-2.59
INPP5A	3632	Inositol polyphosphate-5-phosphatase, 40kDa	-2.04
TNS	7145	Tensin 1	-2.08
ICOSL	23308	Inducible T-cell co-stimulator ligand	-2.63
MYLK3	91807	Myosin light chain kinase 3	-2.66
CTBP2	1488	C-terminal binding protein 2	-2.17
SFRS3	6428	Splicing factor, arginine/serine-rich 3	-2.16
TTC39B	158219	Tetratricopeptide repeat domain 39B	-2.44
RNGTT	8732	RNA guanylyltransferase and 5'-phosphatase	-2.24
FNDC3B	64778	Fibronectin type III domain containing 3B	-2.31
HNRPLL	92906	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like	-2.39
MITF	4286	Microphthalmia-associated transcription factor	-2.26
TBC1D9	23158	TBC1 domain family, member 9 (with GRAM domain)	-2.26
WWOX	51741	WW domain containing oxidoreductase	-2.86
CAB39	51719	Calcium binding protein 39	-2.46
RASGRP1	10125	RAS guanyl releasing protein 1	-2.50
TAOK3	51347	TAO kinase 3	-2.54
UBE3A	7337	Ubiquitin protein ligase E3A	-3.31
TRIM9	114088	Tripartite motif-containing 9	-3.03
HIVEP2	3097	Human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein	-4.35

Empleando designaciones de la base de datos “**Gene Ontology**” (WebGestalt), observamos que los genes que **umentaban** su expresión en respuesta a la RUV estaban agrupados en varios grupos funcionales, incluyendo: metabolismo del ADN, **ciclo celular**, **respuesta a estrés y respuesta inflamatoria**. Otros grupos funcionales, que incluían **metabolismo del ARN y genes implicados en motilidad celular** tenían fundamentalmente una **expresión génica disminuida**.

Para corroborar estos resultados de los microarray mediante un acercamiento experimental independiente, como hemos señalado en material y métodos, se seleccionaron **24 de los genes** modulados para analizarlos por ensayos de **RT-PCR con sondas Taq-Man**. Los genes seleccionados se eligieron fundamentalmente por sus potenciales funciones inmunorreguladoras. Entre estos genes encontramos varios publicados que tenían acciones relevantes en la **regulación de la respuesta inmune**, incluyendo **CD163**, el **ligando coestimulador inducible (ICOSL)**, **IL1**, **proteína adaptadora Scr-like [254]**, la **trombospondina-1 (THBS1)**, **IL10**, **GADD45A**, **GADD45B**, **Galectina 1**, **Galectina 3**, **SLA CXCR4**, **SOCS1**, **PTPE**, **CCR7**, e **IL12A**. Como controles, incluimos en nuestro estudio



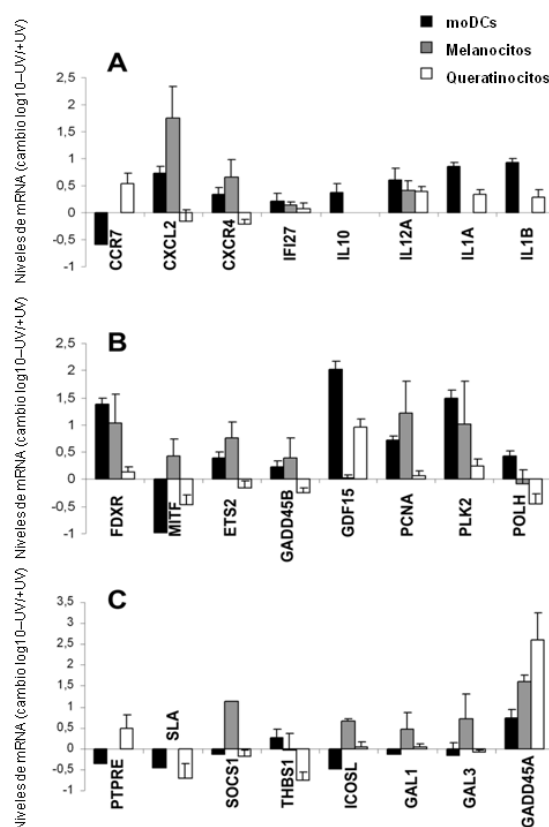
varios genes cuya respuesta al estrés tras la radiación UV ya era conocida (**GDF15**, **FDXR**, **PLK2**, **PCNA**). El análisis por RT-PCR fue llevado a cabo con las mismas muestras empleadas para los microarray. Los resultados confirmaron los cambios en la expresión de todos los genes testados excepto AICDA y CD163 (Fig.45).



**Figura 45: Análisis de la expresión génica en DCs humanas irradiadas con RUV por RT-PCR.** Se realizó PCR a tiempo real con sondas Taqman para validar la expresión génica diferencial inducida por la radiación UV en células dendríticas humanas derivadas de monocitos (moDCs) en cultivo. Las DCs (obtenidas de 3 donantes) fueron expuestas a radiación UV solar simulada ( $3,7 \text{ J/cm}^2$  UVA+ $0,3 \text{ J/cm}^2$  UVB) o no irradiadas. El ARN total fue extraído tras 6 horas más en cultivo. Las barras corresponden al  $\log_{10}$  de la expresión suprimida o inducida de los genes comparando con las células no irradiadas.

### 5.3.2 Expresión diferencial de genes en DCs humanas comparadas con queratinocitos humanos y melanocitos humanos

La regulación por radiación UV del grupo completo de 24 genes fue estudiada en DCs y comparada con queratinocitos y melanocitos humanos obtenidos de cultivos primarios. La dosis de irradiación fue la misma para los 3 tipos celulares; no se detectó apoptosis celular en el momento del análisis de la RT-PCR. De acuerdo con los resultados de expresión génica, los 24 genes se clasificaron en **3 grupos funcionales**: i) genes que codifican para **receptores de citocinas y quimiocinas** (Fig.46A), ii) genes relacionados con **daño al ADN y respuestas de p53** (Fig.46B), y iii) genes potencialmente involucrados en **inmunomodulación** (Fig. 46C).



**Figura 46: Expresión génica inducida por la radiación UV en células primarias humanas: DCs, MCs y KCs.** Las DCs humanas primarias derivadas de monocitos (moDCs), melanocitos (MCs) y queratinocitos (KC), fueron expuestas a radiación solar simulada (3,7J/cm<sup>2</sup> UVA+0,3 J/cm<sup>2</sup> UVB) como en la Fig.1 y el ARN total fue extraído tras 6 horas en cultivo. A. Genes que codifican citocinas y receptores de quimiocinas. B. Genes relacionados con daño al ADN y respuesta de p53. C. Genes potencialmente implicados en inmunomodulación. Los resultados se expresan como el log10 de la expresión reducida o inducida de los genes en células irradiadas con luz UV comparada con la expresión en células no irradiadas. Los datos se corresponden con la media aritmética ± desviación estándar (DE).

En respuesta a la radiación UV solar simulada, tanto las **DCs como los KCs aumentaban la expresión de genes implicados en respuestas inflamatorias (IL-12A, IL-1A e IL-1B)** (Fig.46A). Sin embargo, mientras que las DCs reducían la expresión de CCR7 y aumentaban la de CXCR4, en KCs humanos observamos el resultado opuesto (Fig.46A). La expresión del gen CCR7 no se detectó en melanocitos, sin embargo, en estas células se apreció una inducción importante de CXCR4 y CXCL2. Se observó la inducción de IL10 en las DCs humanas, sin embargo no se detectó ARNm de esta citocina en KC o MC.

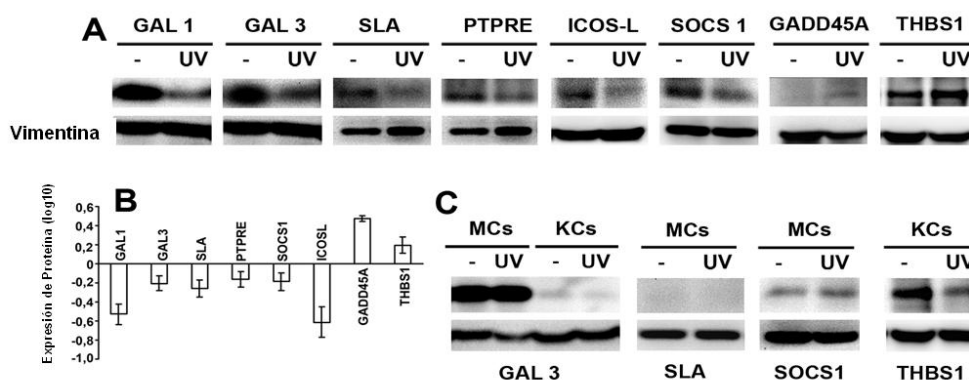
Varios **genes implicados en daño al ADN y respuesta al estrés estaban inducidos en distinta medida en los 3 tipos celulares testados**; por ejemplo FDXR, PCNA, PLK2 y GADD45A (Figs.46B y 46C).

La mayor concentración de resultados de genes regulados específicamente por tipo celular fue la observada entre los **genes inmunorreguladores** (Fig.46C). Las DCs irradiadas con UVA+UVB disminuyeron la expresión del gen que codifica para la **proteína tirosina fosfatasa épsilon (PTPE)**, mientras que se observó inducción del gen en KCs idénticamente tratados. De forma similar a PTPE, la expresión de **SLA** estaba reducida en DCs humanas en respuesta a irradiación UVA+UVB, mientras que el ARNm de SLA no se detectó en MCs bajo nuestras condiciones experimentales. Aunque se observó disminución en la expresión de SLA en KCs humanos, cabe destacar que la expresión de SLA en estas células fue muy pequeña comparada con la de DCs humanas.

Otros genes que mostraron un claro patrón de expresión diferencial en DCs comparadas con MCs o KCs incluyen a la **proteína supresora 1 de la señalización de citocinas (SOCS1)**, molécula inhibidora de la señalización de STAT. SOCS1 estaba inhibido en respuesta a la RUV en DCs humanas y en KCs humanos, pero estaba marcadamente inducido en melanocitos (Fig.46C). La expresión de **trombospondina 1 (THBS1)**, que es un factor antiangiogénico con importantes propiedades inmunomoduladoras, mostró una modulación muy variable en respuesta a radiación UV en MCs, y no se observó un claro patrón de regulación. El **ligando coestimulador inducible (ICOSL)** tenía una expresión disminuida en DCs humanas pero estaba inducido en MCs (Fig.46C). La exposición a **UVA+UVB** provocó una **disminución de la expresión de Gal-1 y Gal-3 en DCs humanas en contraste con los melanocitos que presentaron un importante incremento en la expresión de ambas** (Fig.46C). Finalmente, la exposición solar simulada indujo un claro aumento de la expresión de genes que codifican para GADD45A en los 3 tipos celulares testados (Fig.46C).

### 5.3.3 Expresión de proteínas de los genes expresados de forma diferencial en DCs en respuesta a la radiación UV

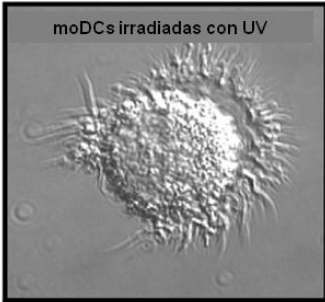
Los resultados de la expresión de ARN por RT-PCR fueron corroborados a nivel de proteína por Western blot empleando lisados de DCs. La Fig.47A muestra un WB representativo de las proteínas codificadas por genes regulados en DCs en respuesta a la radiación UVA+UVB; por otra parte, la cuantificación de 3 experimentos independientes se muestra en la Fig.47B. De acuerdo con los datos de la RT-PCR, la **exposición de DCs humanas a radiación solar simulada resultó en una clara disminución de la expresión de Gal-1, Gal-3, SLA, PTPRE, ICOSL y SOCS1 a nivel de proteína comparadas con DCs no radiadas**. También, de forma consecuente, la radiación UV indujo un **incremento en las cifras de GADD45A y THBS1** a nivel de proteína. La expresión de proteínas por WB de varias moléculas también fue llevada a cabo en MCs y KCs humanos como controles internos (Fig.47C). Estos resultados confirman la ausencia de expresión de SLA en MCs, así como la elevada expresión de galectina-3 en estas células. También, se observó la disminución de la expresión de THBS1 en respuesta a la radiación UV en queratinocitos humanos.



**Figura 47: Western blot de proteínas seleccionadas cuyos genes estaban expresados diferencialmente en DCs.** Las DCs humanas primarias fueron expuestas a radiación solar simulada ( $3,7\text{J}/\text{cm}^2$  UVA+ $0,3\text{J}/\text{cm}^2$  UVB) como en la Fig.45 y cultivadas durante 24 horas previas a la lisis e inmunoblotting. Los experimentos se repitieron al menos en tres ocasiones. Las bandas de proteínas específicas fueron cuantificadas por densitometría con respecto a vimentina (control de carga) A. Lisados representativos. B. Resultados del análisis densitométrico, representado como la proporción de expresión en células irradiadas con la encontrada en células no irradiadas. Los datos representan las medias aritméticas  $\pm$  DE de tres experimentos. C. Los MCs y KCs humanos fueron expuestos a radiación solar simulada y analizados por western-blot como en A.

En la Tabla 10, se muestra un resumen de los genes modulados por la radiación UV solar simulada estructurados por grupos funcionales. En todos ellos aparece que, en el mayor porcentaje, la expresión de los genes estaba aumentada. Sin embargo, otros grupos funcionales que incluyen a aquellos relacionados con el Metabolismo del ADN y ARN y los Procesos del Sistema Inmune tienen principalmente disminución en la expresión de genes.

**Tabla 10: Resumen de los Genes modificados en DCs por la radiación solar simulada.** Los genes inducidos o suprimidos en DCs humanas irradiadas con RUV comparadas con DCs no irradiadas fueron reunidos en grupos funcionales empleando las designaciones de "Gene Ontology" (WebGestalt) y la literatura publicada. Los genes en **negrita** e *italica* corresponden con los genes suprimidos. (\*) Los genes seleccionados con asterisco fueron corroborados por RT-PCR.

Metabolismo ADN, ARN	Diferenciación celular	Citoesqueleto, adhesión y migración
HIST1H2BD HIST2H2BE DOT1L POLH* PCNA* GADD45A* <b>SFR3</b> <i>RNGTT</i> <i>HNRPLL</i> <i>PPFIBP2</i> <i>LUCL7L2</i>	ETS2* <b>MITF*</b>	MYO5B CDC42EP3 PCDH12 CXCR4* <b>TNS</b> <b>MLCK3</b> <b>CCR7*</b>
Procesos del sistema inmune		<b>Respuesta al estrés</b> GADD45A* GADD45B* PCNA* POLH* PMAIP THBS*
IFI27* GADD45A* GADD45B* THBS1* GDF15* <b>SLA*</b> <b>PTPRE*</b> <b>ICOSL*</b> <b>GAL1*</b> <b>GAL3*</b> <b>GAL7*</b>	<b>Supervivencia y ciclo celular</b> DIRAS3 CCNL1 PLK2* PHLDA2 FDXR <b>WOXX</b>	<b>Respuesta inflamatoria</b> CXCL2* IL1A* IL1B* CCL7 IL8

## 5.4 DISCUSIÓN

El sistema inmune asociado a la piel, como hemos reflejado en la introducción, proporciona un compartimento inmunológico altamente reactivo que está implicado críticamente en la mayoría de las enfermedades inflamatorias crónicas cutáneas incluyendo psoriasis y dermatitis atópica entre otras [52]. También hemos remarcado que la RUV tiene un efecto inmunosupresor que puede estar implicado en el desarrollo de cáncer de piel y que favorece el empleo de la fototerapia en el tratamiento de enfermedades inflamatorias

cutáneas como la psoriasis [255, 256]. Por tanto, nuestro objetivo fue identificar los genes regulados en DCs derivadas de monocitos (similares a las células dendríticas dérmicas) en respuesta a la radiación UV empleando un simulador solar, prestando especial atención en aquellos genes implicados en la regulación de la respuesta inmune y comparándolos con los resultados en MCs y KCs humanos. Empleando el método computacional GSEA (con la base de datos “Gene Ontology”) y la revisión intensiva de la literatura recientemente publicada, observamos que, además de los genes que era esperable encontrar como modificados por la radiación UV, la radiación solar simulada induce la modulación de un importante grupo de genes implicados en la respuesta inmune. **Este estudio ha puesto de manifiesto la regulación de varias moléculas en DCs humanas que podrían estar participando en la función de dichas células.**

Las respuestas transcripcionales a la radiación UV pueden variar con la dosis o según el tiempo transcurrido tras la irradiación. Por otra parte, además de su efecto inmunosupresor, la RUV es un importante estímulo inflamatorio. La función de la RUV en la respuesta inmune se ha estudiado en diferentes condiciones, p.e. exposición UV aguda o crónica, sólo UVB, sólo UVA, o con menor frecuencia con una combinación de ambas, entre otros parámetros. Sería esperable que con una particular dosis de radiación, ambas, inducción o represión de la respuesta inmune podría estar presente. En este estudio, hemos determinado la **modulación de genes en un determinado momento puntual en el tiempo y con una única dosis de radiación, empleando una combinación de radiación UVA+UVB**. Como esperábamos, varios de los genes típicamente asociados a daño por la RUV estaban inducidos, por ejemplo, genes involucrados en **daño al DNA y señalización de p53**, incluyendo entre ellos a **GDF15, FDXR, POLH, PCNA y PMAIP1**. Estos datos concuerdan con los resultados publicados previamente para células linfoblastoides humanas y melanocitos humanos [12, 257], confirmando así la reproducibilidad de nuestro estudio. Asimismo, otros genes cuya modulación por radiación UV ha sido previamente descrita en otras células tales como **GADD45, PLK2 e IL-1** estaban inducidos en los tres subtipos celulares examinados, un hecho que nos permite validar también nuestras condiciones experimentales. Hay una evidencia creciente de que **GADD45A**, un gen diana de p53, tiene importantes funciones en la regulación del sistema inmune aparte de su implicación en tareas tales como: detención del ciclo celular, reparación del ADN y supervivencia celular, es por esto que nosotros incluimos esta molécula también en el grupo de genes inmunorreguladores [258].



**La radiación solar simulada sobre las DCs incrementa la expresión de varias citocinas inflamatorias.** También se conoce que los KCs producen y secretan un gran número de factores solubles proinflamatorios tales como IL-1, IL-5, IL-8, TNF-alfa y prostaglandina E2, y de este modo participan en el comienzo de la inflamación y la inducción de quimiotaxis hacia la piel [259, 260]. A este respecto, encontramos que genes como **IL-1A e IL-1B** estaban **inducidos en KCs**, mientras que los niveles de ARNm de estas citocinas eran indetectables en MCs bajo nuestras condiciones experimentales.



Aparte de los grupos funcionales que esperábamos encontrar regulados (respuesta al estrés, inflamación y ciclo celular o supervivencia celular) se detectaron otros grupos funcionales relevantes para la función de las DCs (Adhesión y Migración, Proceso de la Respuesta Inmune y Diferenciación Celular). La **migración alterada de LCs y DCs tras la irradiación UV** ha sido descrita, aunque las moléculas implicadas en este proceso no han sido aún completamente definidas. Publicaciones previas han mostrado que la radiación ultravioleta solar simulada induce defectos en la quimiotaxis de células dendríticas humanas, asociados a una expresión **incrementada de CXCR4 y un fallo en la inducción de CCR7** [251, 261]. Nuestros presentes resultados corroboran la expresión alterada de estos genes a nivel de ARNm en DCs humanas irradiadas mientras que encontramos lo contrario en KCs (sobreexpresión para CCR7 y una disminución en la expresión de CXCR4). En las células de Langerhans se ha visto que la migración se produce en dos fases: de la **epidermis a la dermis requiere CXCR4 y de la dermis al ganglio linfático** necesita la expresión del receptor de quimioquinas **CCR7**. Según esto, la radiación UV daría como resultado un aumento de DCs en la dermis que quedarían retenidas por el defecto en la migración hacia el ganglio de drenaje de la piel [262].

Entre los mecanismos implicados en la **inmunosupresión inducida por la RUV**, es bien conocida la acción de **linfocitos T reguladores** inducidos por ésta [263] y los mediadores inmunosupresores tales como **prostaglandina E2, IL-4 e IL-10**. En la piel humana, la IL-10 está producida principalmente por macrófagos CD11+ tras la exposición a la RUV. De hecho, se ha descrito que la secreción de **IL-10 está disminuida en las DCs radiadas con UV** [264] pero paradójicamente, tras su incubación con lipopolisacárido (LPS, un potente inductor de la respuesta inmune), las DCs irradiadas son capaces de producir grandes cantidades de IL-10 [251]. **En nuestro estudio, encontramos que la expresión de ARNm para IL-10 estaba incrementada en DCs humanas irradiadas con UV**. Sin embargo, no se detectó la expresión de ARNm de IL-10 en melanocitos o queratinocitos.

La **trombospondina-1 (THBS-1)** es una glicoproteína matricelular con propiedades anti-angiogénicas. En los últimos años se ha obtenido un cúmulo de evidencias acerca de la función de la THBS-1 en la respuesta inmunológica. En DCs, se sabe que la THBS-1 actúa como un regulador autocrino negativo; las moDCs humanas inmaduras producen THBS-1 de forma espontánea y esta secreción se incrementa por estímulos microbianos [265]. La distinta regulación de THBS-1 por DCs y KCs tras la exposición a la RUV (inducción e inhibición, respectivamente) podría estar asociada a las diferentes funciones de THBS-1 en estas células. Los queratinocitos de la **piel psoriásica** se caracterizan por una angiogénesis desmesurada de los vasos dérmicos, mostrando una **reducción en la producción de THBS-1 siete veces inferior** a la encontrada en piel normal [266]. De acuerdo con artículos previos, **los KC humanos de nuestras muestras, expuestos a radiación UVA+UVB sufrían una disminución de la expresión de THBS1** [267]. En contraposición, la **radiación UV en DCs induce un incremento de la expresión de ARNm de THBS1**.

Otros dos genes diferencialmente expresados en DCs tras radiación UV fueron **SLA y PTPE**. **SLA** es un regulador de los niveles de TCR en timocitos y también regula el desarrollo de los linfocitos B [268, 269]. Nuestro conocimiento sobre estas moléculas en DCs es limitado. Empleando microarrays de oligonucleótidos y proteómica, se ha descrito que **SLA se expresa durante la diferenciación de DCs** [270]. Nuestros datos muestran que un estímulo inflamatorio o tolerogénico puede ser capaz de modificar la expresión de SLA en DCs humanas. La expresión de la forma citosólica de **PTPE** se encuentra restringida principalmente a tejidos hematopoyéticos, y está inducida durante la diferenciación y/o activación de los macrófagos [271], y su expresión incrementada suprime la señalización JAK-STAT inducida por IL-6 e IL-10 [272]. De manera relevante, la producción de IL-10 en respuesta a LPS está incrementada en macrófagos procedentes de médula ósea deficientes en PTPE.

En resumen, nuestros datos de los microarray muestran la **modulación de genes inmunorreguladores tales como ICOSL, SLA, PTPE, o THBS-1, SOCS1, galectina-1 y galectina-3 tras la RUV solar simulada**. Este estudio, por lo tanto, nos ha permitido identificar la expresión de moléculas inmunorreguladoras que previamente habían recibido muy poca atención en relación a las DCs humanas. Tras “sacar a la luz” estos genes es necesario corroborar su expresión a nivel proteico, dado que la información de esta expresión no puede ser simplemente predicha examinando el ARNm. Por ese motivo los resultados de los microarrays se comprobaron por RT-PCR y WB. La identificación de

	<p>INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL EN INMUNODERMATOLOGÍA: DE LAS MOLÉCULAS INMUNORREGULADORAS MODULADAS POR RADIACIÓN ULTRAVIOLETA AL PAPEL DE LAS GALECTINAS EN PACIENTES CON PSORIASIS</p>	
---	---	---

proteínas selectivamente reguladas en DCs por la RUV nos ha servido de ayuda en el entendimiento de la función biológica de estas células.

## 6. ESTUDIO 2: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GALECTINAS EN CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS DE PACIENTES CON PSORIASIS

### 6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar la expresión de las lectinas y citocinas en la piel de pacientes con psoriasis (lesional y no lesional), así como en la piel de sujetos sanos.
2. Estudio de la expresión y localización de las galectinas en las células de Langerhans y otras células dendríticas de la piel normal.
3. Determinar la expresión de aquella(s) galectina(s) que resultara modificada en pacientes con psoriasis con respecto a sujetos sanos en subpoblaciones de células dendríticas, tanto en piel como en sangre periférica.
4. Estudios de correlación clínica.
5. Estudios funcionales de galectinas en células dendríticas.

### 6.2 MATERIAL Y MÉTODOS

Nuestro estudio se realizó de acuerdo a los principios de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité Ético local del Hospital Universitario de La Princesa.

#### 6.2.1 Sujetos de estudio y recopilación de muestras

Se incluyeron las siguientes poblaciones:

- **Pacientes con psoriasis en placas moderada-severa (Anexos 1 y 2)**

**Criterios de inclusión:** 1) Paciente mayor de 18 años de edad; 2) Psoriasis crónica en placas con una duración de la enfermedad de al menos 6 meses desde el diagnóstico; 3) Psoriasis moderada-severa definida por un *Psoriasis Area and Severity Index* (PASI) mayor de 10 o una superficie corporal afecta (*Body Surface Area*, BSA) mayor del 10%; 4) Firma de consentimiento informado (Anexo 2).

**Criterios de exclusión:** 1) Psoriasis eritrodérmica, psoriasis pustulosa localizada o generalizada o psoriasis en gotas; 2) Historia de inmunosupresión u otros factores asociados a la misma, incluyendo infección por el virus de la inmunodeficiencia humana; 3) Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia; 4) Tratamiento con corticoides

tópicos en las 2 semanas (14 días) previas al inicio del estudio; 5) Tratamiento sistémico (corticoides, metotrexato, ciclosporina, acitretino o fototerapia) dentro de un periodo de lavado de 4 semanas (28 días); 6) Tratamiento con un agente biológico (etanercept, infliximab, efalizumab o adalimumab) dentro de un periodo de lavado de 12 semanas (84 días); 7) Pacientes que, por cualquier razón, sean considerados no aptos para ser incluidos en el estudio por el investigador principal.

De esta población se obtuvieron: una muestra de sangre y dos biopsias cutáneas mediante punch de 8 mm, una de piel lesional y otra de piel no lesional a no menos de 5 cm de la biopsia de piel lesional, preferentemente en zonas no fotoexpuestas (e.g. nalga).

- **Pacientes sometidos a intervenciones quirúrgicas (abdominoplastias) sin enfermedades cutáneas inflamatorias. En adelante denominados “población sana”**

De esta población se consiguió una muestra de sangre y otra de piel aparentemente sana a partir de piel sobrante de intervenciones quirúrgicas (abdominoplastias). Todo ello tras la firma del consentimiento informado.

Los datos relativos al **sexo, edad, duración de la psoriasis y gravedad clínica de la psoriasis** (PASI y BSA) se presentan en la Tabla 11.

**Tabla 10: Características clínicas de los pacientes con psoriasis y los sujetos sanos.** Los resultados están expresados como medias (rango intercuartílico). M: masculino; F: femenino; PASI: psoriasis area and severity index; BSA: body surface area).

	PACIENTES CON PSORIASIS	SUJETOS SANOS
NÚMERO	24	10
SEXO (M/F)	13/11	4/6
EDAD [273]	49,7 (26-81)	49,1 (44-69)
PASI	20,76 (9,3-53)	
BSA (%)	23 (10-90)	
TIEMPO DE EVOLUCIÓN [273]	22,5 (8-63)	

- **Pacientes con dermatitis atópica (Anexo 3)**

**Criterios de inclusión:** 1) Paciente mayor de 18 años y menor de 60 años; 2) No tratamientos sistémicos en el momento de la extracción de sangre periférica; 3) Firma del consentimiento informado; 4) Cumplimiento de los **Criterios diagnósticos de dermatitis atópica según la UK Working Party (UKWP)**: Además del **criterio obligatorio (prurito)**, debían cumplirse **3 ó más criterios** de la siguiente lista:

- Inicio antes de los 2 años de edad (no aplicable a menores de 4 años)
- Localización en zonas de pliegue (incluidas mejillas en menores de 10 años)
- Historia de sequedad cutánea en general
- Historia personal de otra enfermedad atópica (o historia familiar -primer grado- de enfermedad atópica en menores de 4 años)
- Dermatitis visible en flexuras (o dermatitis en mejilla/frente y parte externa de las articulaciones, en menores de 4 años)

La población estaba constituida por 6 pacientes (edad 23-48 años, enfermedad leve=3, enfermedad moderada=3). De esta población se obtuvieron muestras de sangre periférica.

## 6.2.2 Anticuerpos y otros reactivos

El GMC-SF recombinante humano fue adquirido de PeproTech (Londres, RU), y la IL-4 recombinante humana de R&D Systems (Mineápolis, MN, USA). La gal-1 recombinante humana y los anticuerpos de cabra policlonales anti-humanos para gal-1, gal-3, gal-7 y gal-9 fueron obtenidos de R&D systems. Los anticuerpos conjugados con FITC (anti-CD3, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD20) el anti-CD11c conjugado con PE, el anti-HLA-DR conjugado con PerCP, el anti-CD11c conjugado con V450, el anti-IFN $\gamma$  conjugado con FITC y el anti-IL10 conjugado con PE fueron todas de Becton-Dickinson (San José, CA, USA). Los anticuerpos secundarios de burro anti-cabra (DAG, donkey anti-goat) conjugado con AlexaFluor 647, cabra anti-ratón (GAM, goat-anti-mouse) conjugados con AlexaFluor 468 y 568 se obtuvieron de Molecular Probes (Leiden, Países Bajos). La tinción Hoechst 33258 se obtuvo de Invitrogen (Eugene, OR, USA).



### 6.2.3 Procedimientos llevados a cabo en las muestras de piel

Las biopsias fueron fragmentadas en dos mitades, una para la obtención de lisados totales que fueron utilizados en las técnicas de RT-PCR y WB, y las mitades restantes que fueron incluidas en OCT y congeladas en las 4 horas siguientes a su obtención. Se tomaron cortes para tinciones de inmunofluorescencia (piel sana, lesional y no lesional). Para estudiar las galectinas por citometría de flujo se aislaron DCs *ex vivo* sólo de pacientes sanos. Por otro lado, parte de las muestras (piel sana, lesional y no lesional) se emplearon para la extracción de ARN y realizar RT-PCR para lectinas (galectinas y dectinas) y citocinas implicadas en la activación (IL-17) e inhibición (IL-10) de la respuesta inmunológica, con posteriores estudios de correlación con la expresión de gal-1. Por último, se determinó la expresión de gal-1 en lisados de piel total por western blot (ver Fig.48).

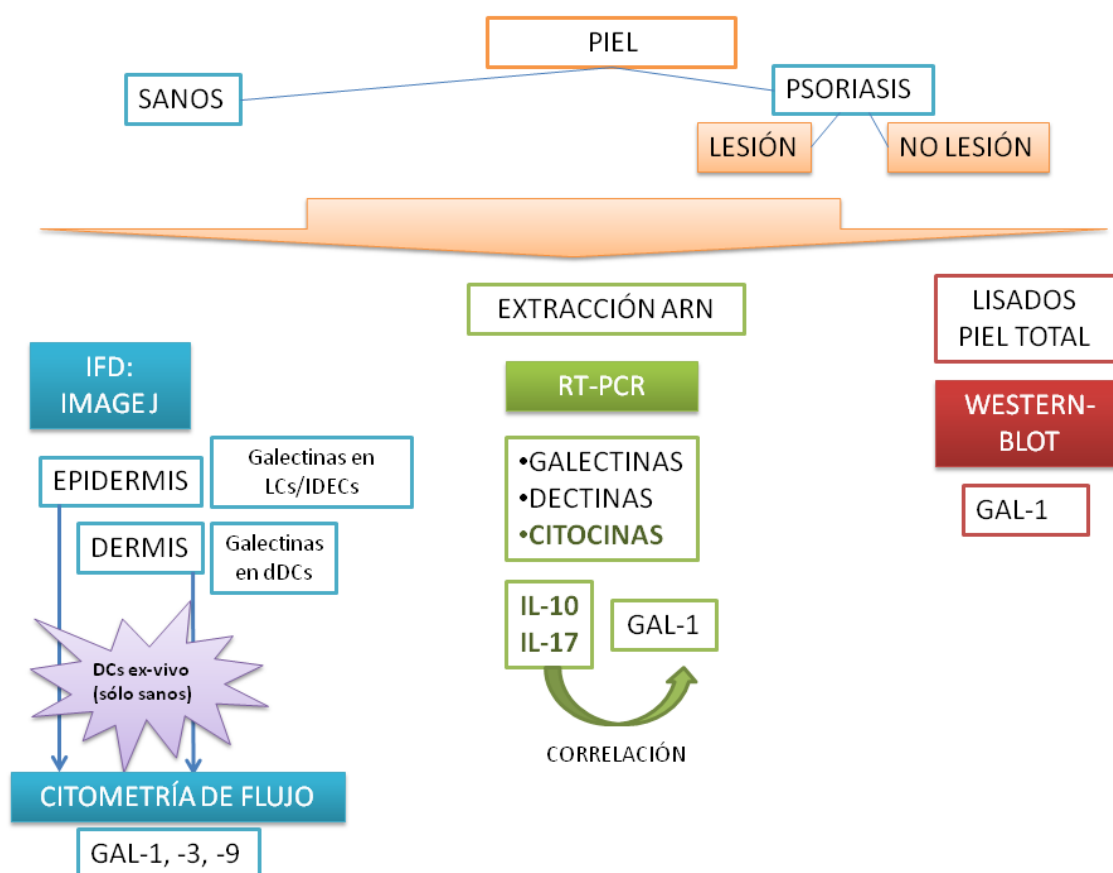


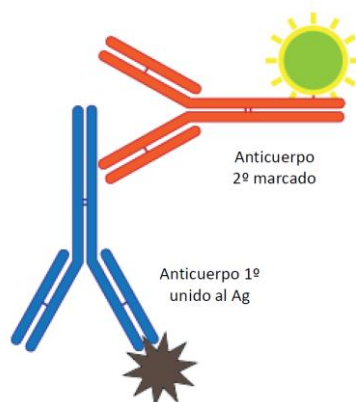
Figura 48: Esquema de los procedimientos llevados a cabo con las biopsias de piel.

### *Tinción con doble inmunofluorescencia y medición de la expresión de galectinas*

La **inmunofluorescencia** es una técnica que utiliza esencialmente anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente para demostrar la presencia de una determinada molécula. En el caso de la **inmunofluorescencia indirecta (IFI)** se utilizan dos anticuerpos: el anticuerpo primario que reconoce y se une a la molécula diana y el anticuerpo secundario que es el que se encuentra marcado con el fluoróforo, reconoce al primario y se une a él (Fig.49).

Los fluorocromos se unen químicamente a los anticuerpos con una elevada afinidad, sin interferir en la especificidad inmunológica del anticuerpo y sin perder la intensidad de su fluorescencia. Las moléculas fluorescentes tienen la particularidad de emitir luz de una determinada longitud de onda al ser excitadas con luz de otra determinada longitud de onda, permitiendo así su cuantificación.

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA



**Figura 49: Técnica de inmunofluorescencia indirecta.** Se preparan los anticuerpos primarios que se unirán al antígeno que queremos determinar. Posteriormente, se añaden los anticuerpos secundarios (anti-anticuerpo primario) marcados con una sustancia fluorescente. Cuando se ve con el microscopio de fluorescencia, la región fluorescente representa la localización del antígeno diana.

En nuestro estudio, los cortes de piel tras su fijación y permeabilización, se **bloquearon con 100 µg/ml de γ-globulina humana** (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) y **5% de suero bovino fetal (SBF) en suero salino tamponado con fosfato (PBS)**. Los cortes se incubaron con **anti-gal-1, anti-gal-3, anti-gal-7 o anti-gal-9**, todos a una concentración de 10 µg/ml durante 1 hora y posteriormente fueron incubados con un anticuerpo secundario acoplado a AlexaFluor 488. También se emplearon anticuerpos anti-CD1a (T6), o anti-CD11c, biotina anti-CMH-clase II y anti-Langerina AlexaFluor647 (Dendritics, Lyon, France). Los cortes se examinaron con **microscopía de inmunofluorescencia** (Leica DMR) bajo las mismas condiciones de adquisición en todas las muestras. Las imágenes se analizaron con el programa ImageJ (<http://imagej.softonic.com>) para cuantificar la expresión de gal-1. Para el análisis de la expresión de gal-1, la intensidad de fluorescencia se determinó en regiones de interés (ROIs) dibujadas en las células que eran CD1a+, Langerina+ para las LCs o CD11c+, CMH clase-II+ para las DCs dérmicas.

Para obtener **las DCs exvivo de la piel sana**, las biopsias fueron procesadas inmediatamente después de su obtención. Brevemente, la muestra fue escindida en múltiples fragmentos e incubada con tripsina. La capa de epidermis, una vez separada de la dermis, fue lavada con PBS 2 veces para eliminar los restos de tripsina y cultivada en placas de 24 pocillos en 1ml de medio de cultivo RPMI al 10%, SBF y antibióticos. A las 48h del cultivo se obtuvo el sobrenadante que contenía las células que migran desde la piel al medio de cultivo. Posteriormente se separan las DCs empleando los anticuerpos específicos.

### *Citometría de flujo*

La citometría de flujo es una técnica de **análisis multiparamétrico**, es decir que se pueden combinar las medidas de distintos parámetros medidos sobre una misma célula y relacionarlos. La esencia de esta técnica está en la posibilidad medir la luz procedente de células individuales que pasan por el haz luminoso de un láser, a razón de miles de células por segundo. Los datos que se obtienen de estas medidas pueden ser analizados estadísticamente por programas informáticos, generando información acerca del **tamaño, complejidad, fenotipo y estado de salud de la población celular que se analiza**. Su funcionamiento consiste en hacer pasar a las células, alineadas y de una en una, por delante de un haz de luz, las partículas al pasar por el rayo luminoso generan señales, las cuales se transforman en **impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que se procesan en el ordenador**. La información generada procede por un lado, de la dispersión de la luz y por otro, de la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula o en una parte de la célula al ser excitada por el rayo luminoso (Fig.50).

Cuando una célula pasa por el punto de detección y el haz luminoso procedente del láser impacta con ella, la célula dispersa la luz en todas las direcciones. La parte de luz que se dispersa en la dirección del haz de luz incidente, se denomina **“forward scatter”**, que podría traducirse como dispersión delantera o **dispersión de avance**. La magnitud de esa dispersión constituye la primera medida importante en la citometría, ya que es aproximadamente **proporcional al tamaño de la célula**. Por lo tanto, este dato se puede utilizar para saber cómo de grandes son las células que estamos analizando y si hay varias poblaciones de diferentes tamaños en nuestra muestra. Los **histogramas de dispersión** característicos que se generan, dan una idea de la distribución de tamaños celulares en una muestra. Una población de tamaño homogéneo genera un histograma en forma de campana de Gauss, con la mayoría de células en un rango de tamaños más o menos estrecho.

La complejidad de la célula analizada puede hacer que muchos de los fotones sean dispersados en ángulos muy abiertos, por ejemplo hacia los lados. Esta complejidad celular viene determinada entre otras cosas por la **presencia en la célula de estructuras específicas o de un gran número de orgánulos**. La luz procedente de este tipo de dispersión es recogida por otro detector específico, normalmente situado en un **ángulo de 90 grados con respecto a la dirección de la luz del láser incidente**. Por este motivo, se denomina a esta señal **“side scatter”**, que puede traducirse como **dispersión lateral**, tal y como se representa en la figura. Además de la dispersión de la luz, si previamente a su

análisis se marca a las células con anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos o fluoróforos, se pueden evaluar cuáles de éstas poseen los antígenos complementarios a los anticuerpos monoclonales utilizados. El uso de diferentes **fluorocromos permite analizar la expresión de varias moléculas de manera simultánea**. Las combinaciones de diversos anticuerpos monoclonales contra antígenos celulares pueden utilizarse para identificar poblaciones celulares específicas.

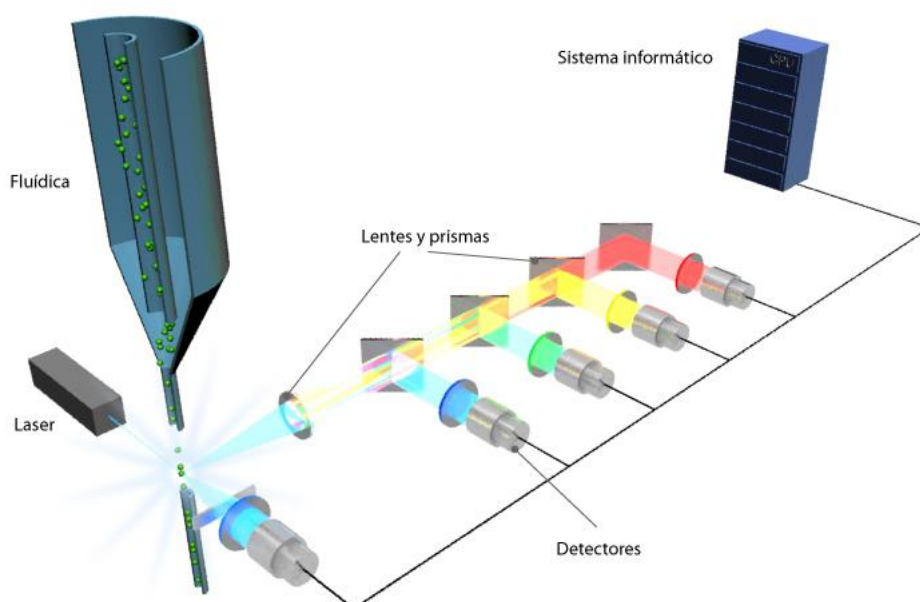


Figura 50: Esquema del funcionamiento de un citómetro de flujo.

Las suspensiones celulares de la epidermis y dermis de la piel de pacientes sanos se obtuvo tras separación de estas capas como está descrito [274]. Para la tinción de las suspensiones de células cutáneas se emplearon los siguientes anticuerpos: FITC-HLA-DR y PE-Anti\_CD1a y anti-gal-1, anti-gal-3 o anti-gal-9 seguidos de AlexaFluor 647-DAG para células epidérmicas, así como Pacific blue-CD11c, Pacific orange-CD45, FITC-HLA-DR para células dérmicas.

#### *Análisis por RT-PCR de citocinas y lectinas*

El **ARN total** de las muestras de piel fue aislado empleando el reactivo TRIzol (Invitrogen). Se empleó 1 µg de ARN para la síntesis del ADNc. Se empleó el sistema “Power SYBR Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems, Warrington, UK) para

amplificar: IL-17a, IL-21, IL-23, IL-12b, IL-10, IL-27, gal-1, gal-3, gal-4, gal-8, gal-9, dectin-1, DCIR y CLEC5A.

#### *Análisis de galectina 1 por Western Blot en lisados de piel total*

El procedimiento de Western Blot ya fue explicado en el apartado 4.1.8.

#### **6.2.4 Procedimientos llevados a cabo en las muestras de sangre periférica**

La sangre periférica de **sujetos sanos** se empleó en primer lugar para el estudio de la expresión de galectinas-1,-3 y-9 así como de ICOS e ICOSL en las distintas subpoblaciones de DCs circulantes (pDCs-CD123+ y mDCs-CD11c+). Los resultados para la gal-1 y gal-9 se comprobaron por WB en lisados totales de mDCs y pDCs previamente aisladas mediante separación celular con *cell-sorter*. Posteriormente se estudiaron las moléculas anteriores (gal-1,-3,-9, ICOS e ICOSL) sólo en las **mDCs para comparar su expresión en sujetos sanos y pacientes con psoriasis**, también mediante citometría de flujo. Tras encontrar que la gal-1 era la molécula con mayores diferencias significativas, fue la elegida para comparar su expresión entre la población sana y los pacientes con psoriasis y dermatitis atópica, correlacionarla con el PASI en la población psoriásica y hacer los estudios funcionales (ver Fig.51).



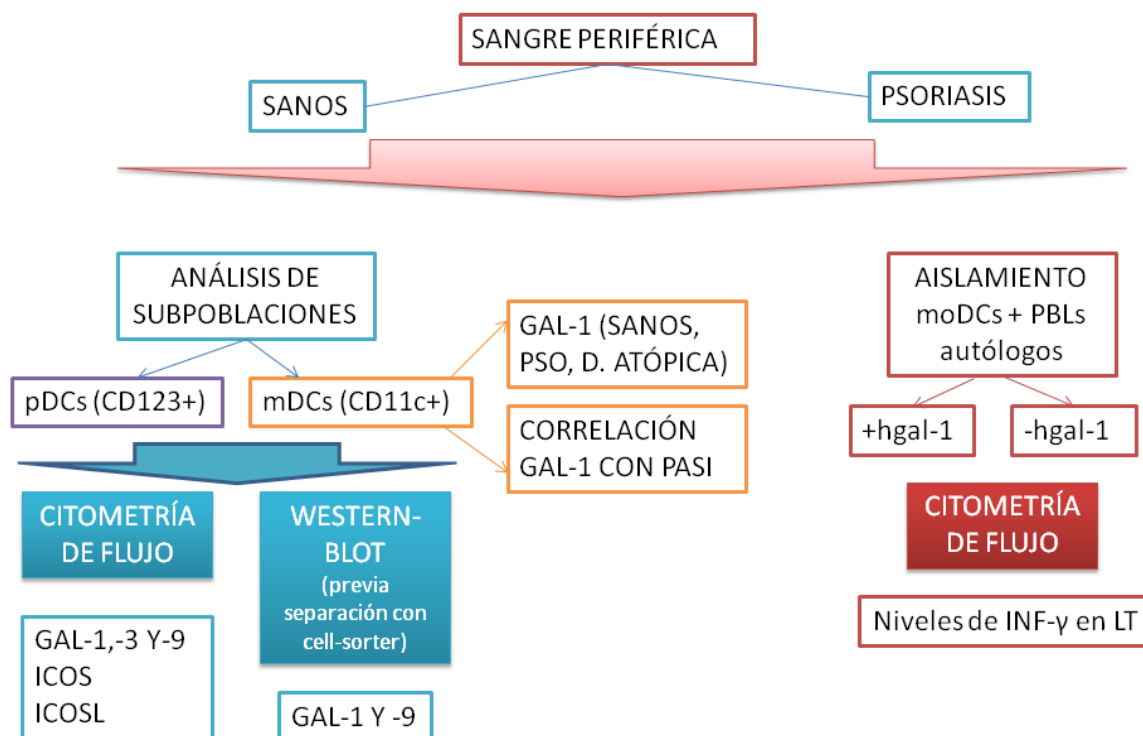


Figura 51: Esquema de los procedimientos llevados a cabo con las muestras de sangre periférica.

### *Análisis de subpoblaciones de DCs en sangre periférica (citometría de flujo, separación celular y western blot)*

En el análisis de la expresión de galectinas en la superficie de células dendríticas primarias de sangre periférica, se emplearon las siguientes tinciones de **anticuerpos de ratón anti-humanos para los monocitos de sangre periférica**: PerCP-HLA-DR, FITC-CD3, FITC-CD14, FITC-CD16, FITC-CD19, FITC-CD20, PE-CD123 y V450-CD11c, así como **anticuerpos de cabra anti-humanos anti-gal1, anti-gal-3 o anti-gal-9 seguidos de AlexaFluor 647-DAG**. Las células dendríticas mieloides (mDCs) y las células dendríticas plasmacitoides (pDCs) se aislaron de los monocitos de sangre periférica mediante separación celular en un separador celular FACS Aria. Las DCs fueron lisadas y determinada la expresión de **galectinas mediante western blot**.

### *Co-cultivo de células dendríticas derivadas de monocitos con leucocitos autólogos de sangre periférica*

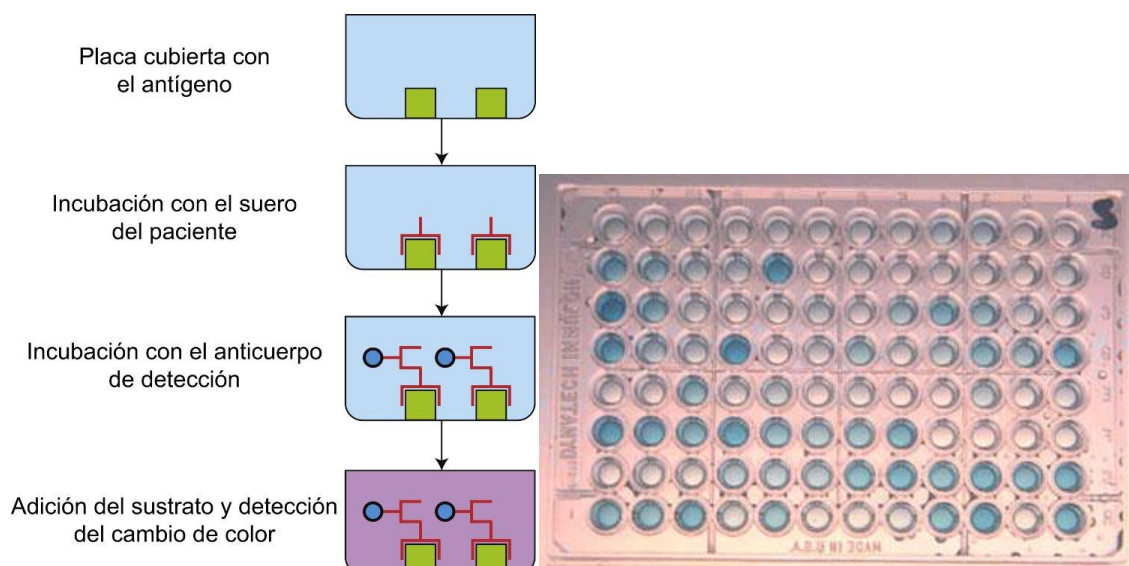
Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se obtuvieron por centrifugación con gradiente de densidad, y las células se dejaron adherir a un plástico durante 30 min a 37°C. Las células adheridas se cultivaron durante 6 días en medio de

cultivo completo suplementado con 500 U/ml de **GM-CSF** (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) y 10ng/ml de **IL-4** (R&D systems). Los cultivos se suplementaron con citocinas los días 2 y 4. En el día 6, se realizaron los **co-cultivos subsiguientes con linfocitos TCD4+ o con leucocitos autólogos**.

Las DCs derivadas de monocitos (moDCs) de pacientes con psoriasis precargados con súper AgE (0,1 µg/ml) fueron co-cultivadas con leucocitos autólogos de sangre periférica (1:10) en presencia o ausencia de gal-1 recombinante humana (hgal-1) 2 µM durante 5 días. Las células se cultivaron y se analizaron los niveles intracelulares de IFN-γ en los linfocitos T empleando citometría de flujo.

### *Reacción mixta linfocitaria*

Las células dendríticas derivadas de monocitos (moDCs) precargadas con SEE (0,1µg/ml) se co-cultivaron con linfocitos TCD4+ heterólogos (ambos de sujetos sanos) en presencia o ausencia de lactosa (50nM). Las células se cultivaron en el día 5 y se midieron los niveles intracelulares de IFNγ mediante análisis por FACS en un citómetro de flujo FACScalibur. La producción de IL-10 fue medida en el sobrenadante de los cultivos por la técnica de ELISA.



**Figura 52: Esquema de la técnica de ELISA indirecto.**

La **técnica de ELISA** (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) es utilizada para la detección

de diversas moléculas biológicas, basándose en la especificidad del reconocimiento antígeno-anticuerpo y en la sensibilidad de las pruebas enzimáticas. De esta manera, se emplean antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmoadsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro (Fig.52).

Los diferentes tipos de ELISA son los que se enumeran a continuación:

- Anticuerpos marcados:
  - ELISA Directo
  - ELISA Indirecto
  - ELISA sándwich
  - Doble (DAS)
  - Heterólogo (HADAS)
- Antígeno marcado
  - ELISA competitivo

### 6.2.5 Análisis estadístico

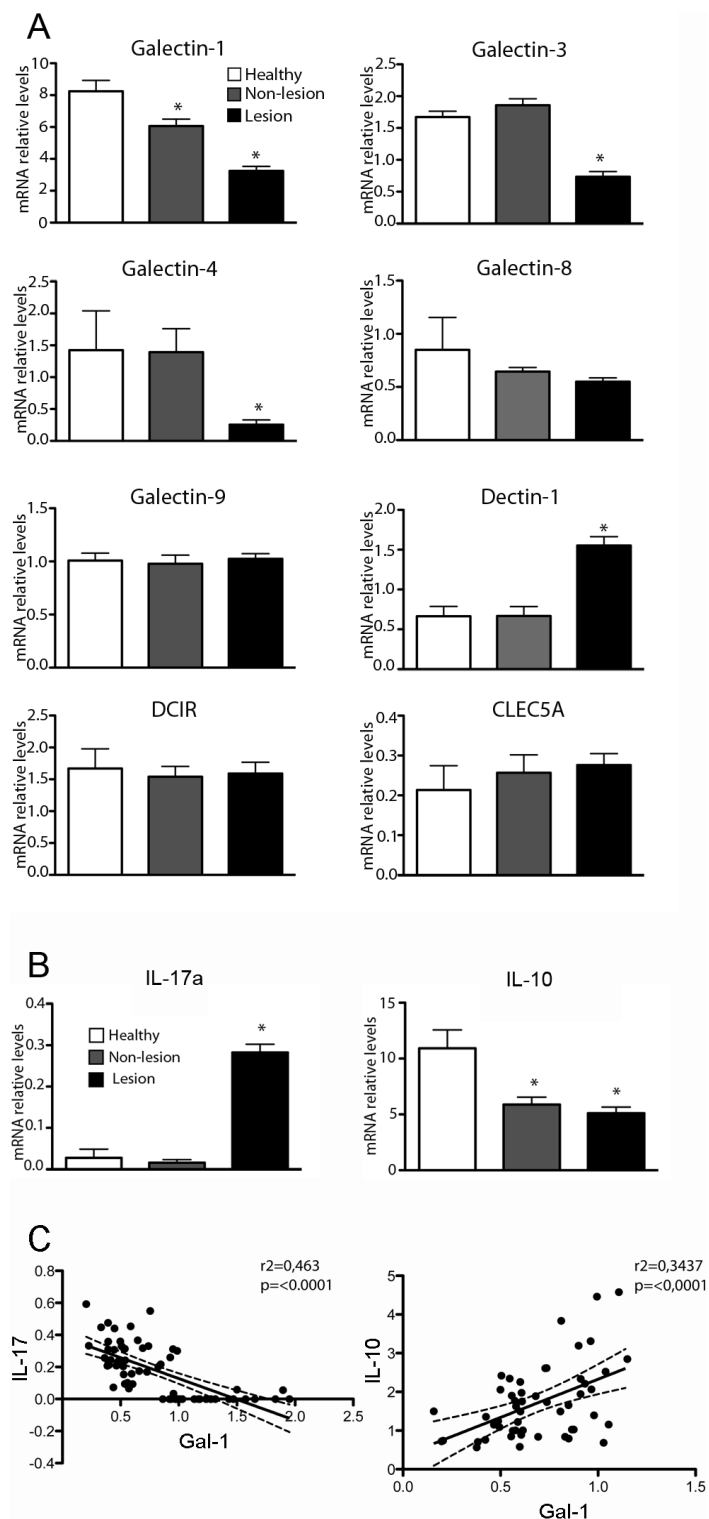
Los datos se analizaron mediante el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Los tests de Kruskal-Wallis y U- de Mann-Whitney se emplearon cuando eran procedentes. El test de Spearman se empleó para el análisis de correlación. La significación estadística se obtuvo con una  $p < 0,05$ .

## 6.3 RESULTADOS

### *La expresión de galectina-1 es defectuosa en la piel psoriásica*

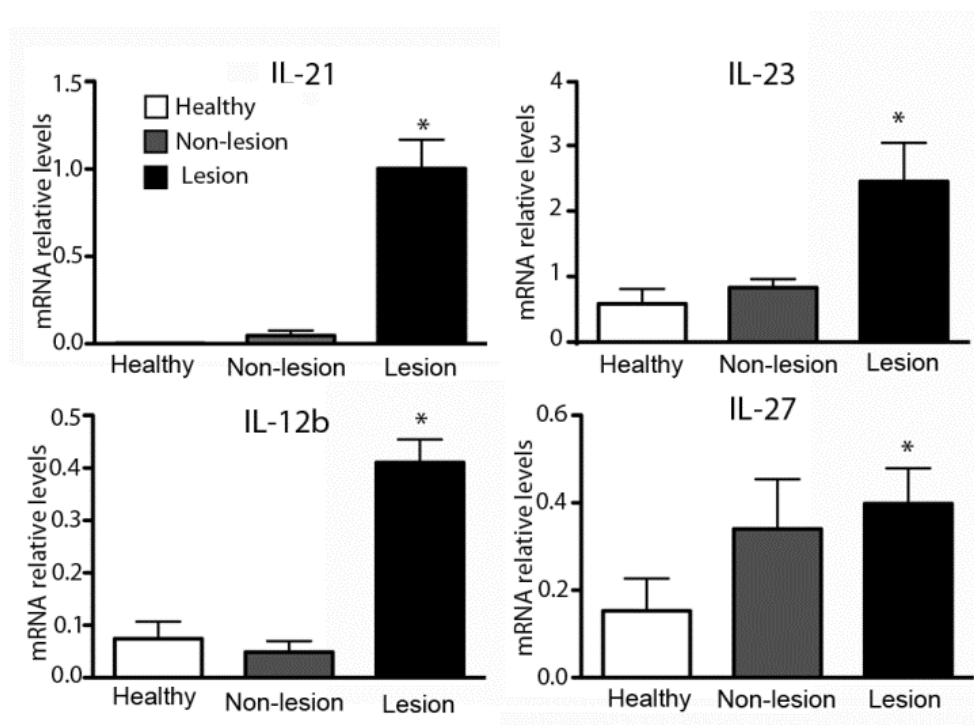
Se realizó el análisis por **RT-PCR** de la expresión de **gal-1, gal-3, gal-4, gal-8 y gal-9** así como de las lectinas **DCIR, CLEC5A y dectina-1** en piel lesional y no lesional de **24** pacientes con **psoriasis** y muestras de **10 controles sanos**. Comparada con la piel de sujetos sanos, las biopsias cutáneas de piel lesional y no lesional de pacientes con psoriasis mostraron una **expresión disminuida de ARNm de galectina-1** (Fig.53A,  $p<0,05$ ). Los niveles de gal-3 y gal-4 también eran bajos en la piel lesional, pero la expresión en la piel aparentemente sana era similar a los niveles hallados en sujetos sanos. En cambio, la expresión de gal-8 y gal-9 fue similar en los tres tipos de muestras (Fig.53A). La **dectina-1** se detectó a un **nivel muy alto en la piel lesional**.

También analizamos la expresión de ARNm de las citocinas Th1 y Th17. El análisis por RT-PCR demostró una **expresión elevada de IL-17a, IL-21, IL-12b e IL-23 en la piel lesional de pacientes con psoriasis comparada tanto con piel no lesional como con muestras de piel de donantes sanos** ( $p<0,05$ , Fig.53B; ver también Fig.54). Encontramos una **mayor expresión de ARNm de IL-27 en la piel lesional** de pacientes con psoriasis que en muestras de la piel de donantes sanos (Fig.54). La expresión de **IL-27** también se encontraba **elevada en la piel asintomática** de pacientes con psoriasis, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa. En cambio, la expresión de la citocina anti-inflamatoria **IL-10 fue baja tanto en la piel lesional como no lesional de pacientes con psoriasis** en comparación con la piel de donantes sanos ( $p<0,05$ , Fig.53B). El análisis estadístico mostró que **los bajos niveles de gal-1 se asociaban con niveles elevados de IL-17** ( $p<0,0001$ ,  $r^2=0,463$ ) y **con niveles disminuidos de IL-10** ( $p<0,0001$ ,  $r^2=0,393$ ) (Fig.53C).



**Figura 53: La piel lesional y no lesional de pacientes con psoriasis expresa niveles bajos de gal-1 e IL-10.** Análisis por RT-PCR de los genes indicados de citocina (A) o de lectina (B) en la piel lesional y no lesional de pacientes con psoriasis y sujetos sanos. Las barras representan la media  $\pm$ SEM de las 24 muestras de psoriasis (negro), 24 no lesionales (gris) y los 10 sujetos sanos (blanco); las diferencias entre grupos fueron analizadas mediante los tests de Kruskal-Wallis y Bonferroni

(\* $p < 0,05$  comparados con sanos). (C) Análisis de correlación de los niveles de ARNm de gal-1, IL-17 e IL-10 de la piel lesional y no lesional de pacientes con psoriasis; la correlación fue testada empleando el test de Spearman.

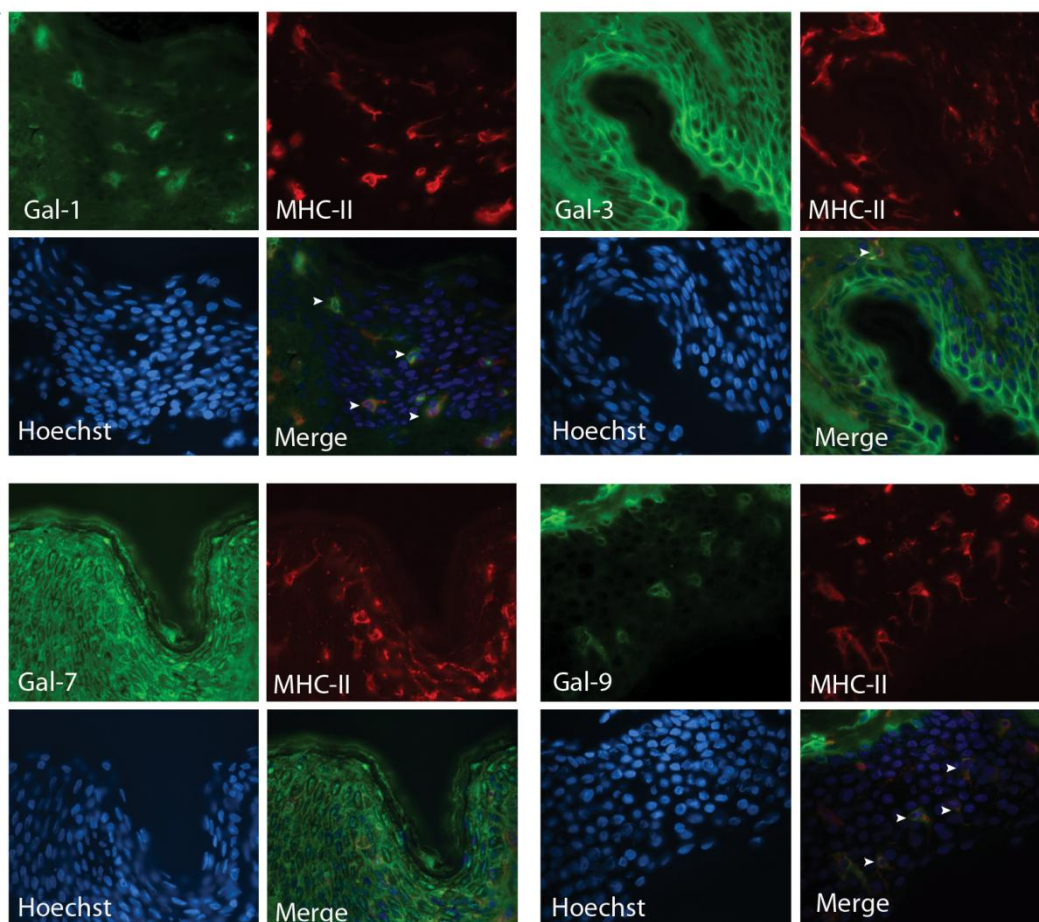


**Figura 54: Expresión de citocinas en las biopsias de piel de pacientes con psoriasis y sujetos sanos por RT-PCR.** Se muestra la expresión de ARNm de las citocinas Th1 y Th17 en las muestras de piel lesional y no lesional de pacientes con psoriasis y en las muestras de sujetos sanos. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de 24 muestras de piel lesional, 24 muestras de piel no lesional y 10 muestras de sujetos sanos. Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por los tests de Kruskal-Wallis y Bonferroni (\* $p < 0.05$ ). Las galectinas-1, -3 y -9 están expresadas en las células de Langerhans de sujetos sanos

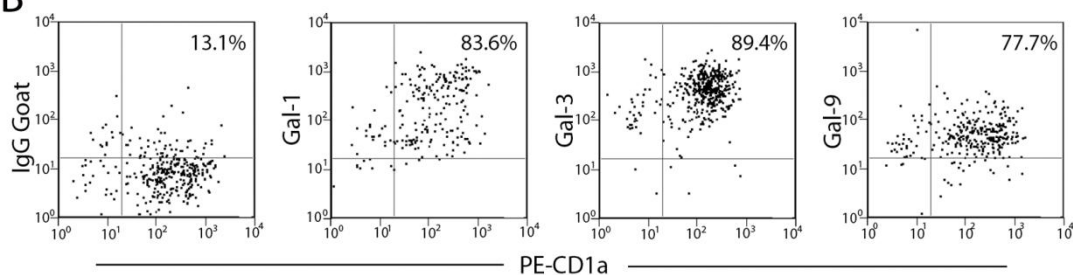
El análisis de las **inmunofluorescencias** dobles en las muestras de piel sana en los que se emplearon anticuerpos del CMH de clase II+ en combinación con cada uno de los anticuerpos contra las distintas galectinas, reveló la **expresión de gal-1 y gal-9** en las células estrelladas que eran positivas para el CMH de clase II en la epidermis, lo cual es indicador de la expresión **en las células de Langerhans (LCs) de sujetos sanos** (Fig.55A). La **gal-3 y la gal-7** estaban altamente expresadas en los queratinocitos de la epidermis (Fig.55A). La elevada expresión de la gal-3 en las células epidérmicas enmascaró la posible expresión de estas galectinas en las células CMH-clase II+ epidérmicas. Para corroborar estos resultados, analizamos la expresión de gal-1, gal-3 y gal-9 en las LCs aisladas de las biopsias de piel de sujetos sanos, el análisis por **citometría de flujo demostró claramente la expresión de gal-1, gal-3 y gal-9 en las LCs** (células CD1a+, HLA-DR+, Fig.55B).



A



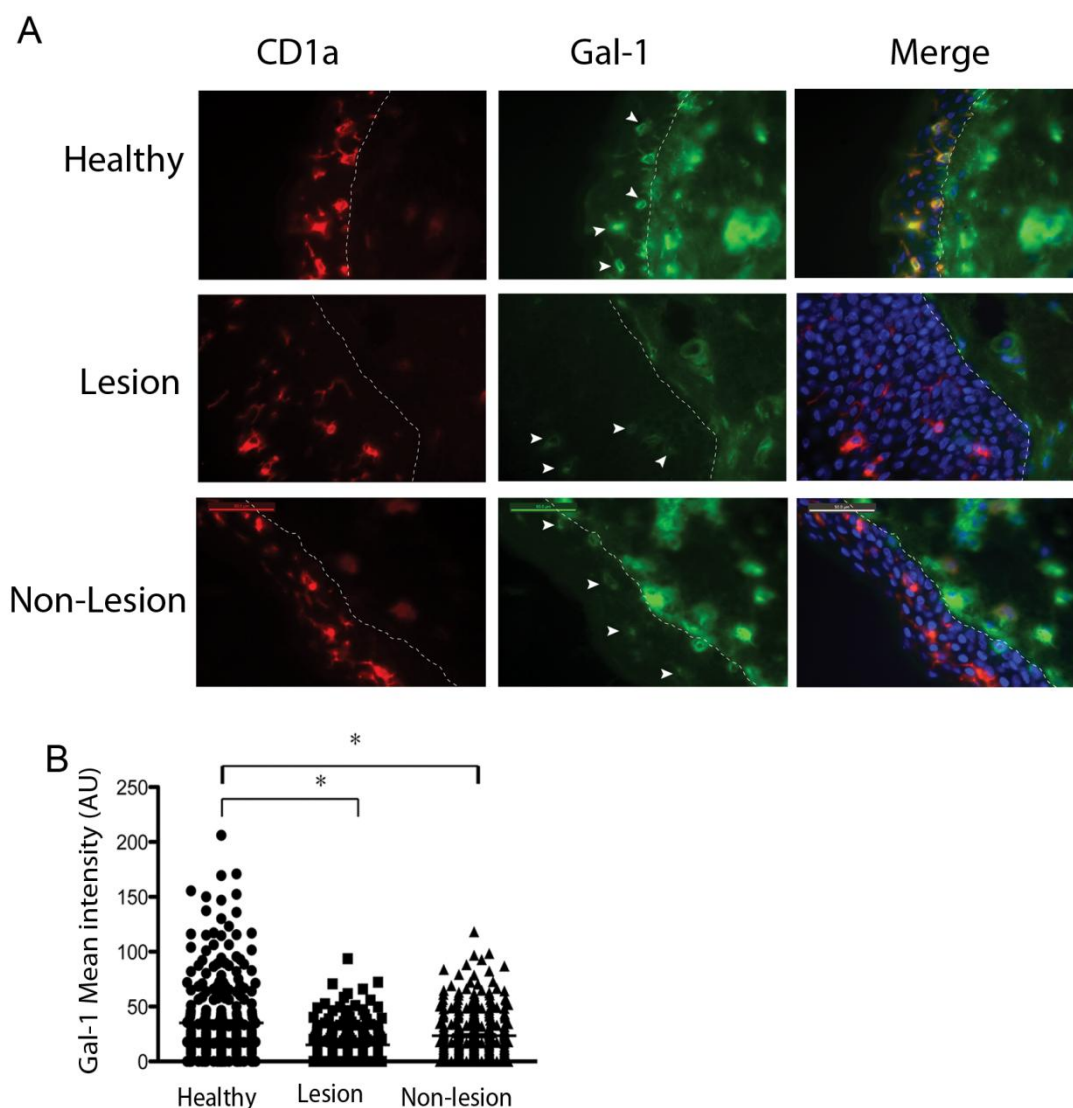
B



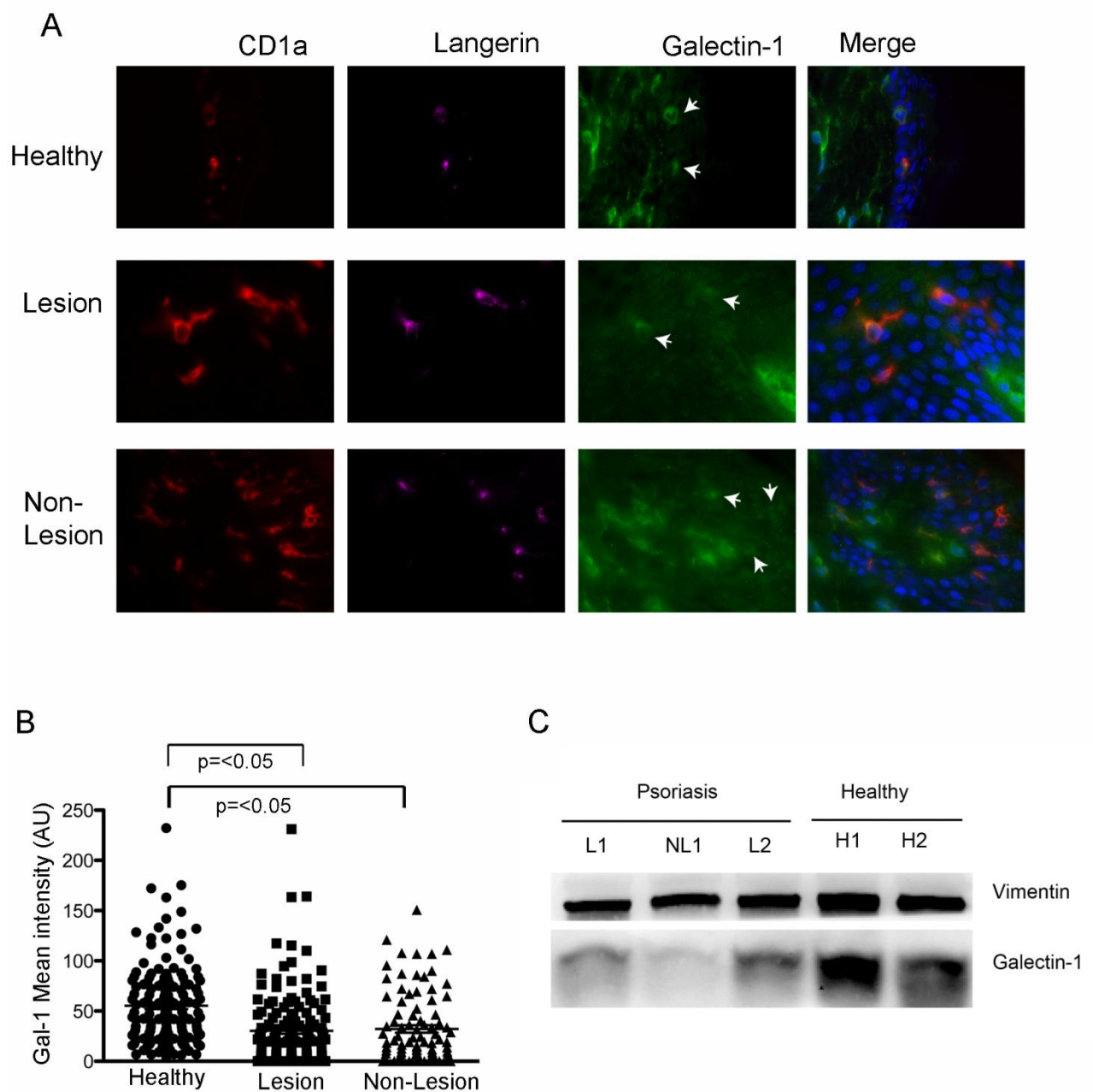
**Figura 55: La gal-1, gal-3 y gal-9 se expresan en las células de Langerhans de la piel normal.** (A) Análisis con doble inmunofluorescencia de la expresión de gal-1,-3,-7 ó -9 (verde) y el CMH-II (rojo) en la piel de un sujeto sano; los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul); las flechas marcan la expresión de galectinas en las LCs. (B) Análisis por citometría de flujo de 3 colores de la expresión de galectinas aisladas ex vivo de la epidermis de los cortes de piel normal. Las células fueron seleccionadas para la expresión de HLA-DR y la expresión de galectina fue determinada en las células CD1a+.

*La expresión de galectina 1 está reducida en las células de Langerhans de pacientes con psoriasis*

La tinción de inmunofluorescencia doble de los cortes de piel de **pacientes psoriásicos** mostró una **débil tinción para gal-1 en las células CD1a+ de la epidermis** en comparación con la de donantes sanos. Para cuantificar esta diferencia, medimos la intensidad de fluorescencia de la tinción de gal-1 en las células epidérmicas CD1a+ en cortes de piel de 8 pacientes con psoriasis y de 8 sujetos sanos (Fig.56A). Este análisis mostró que los **niveles de gal-1 son menores en las DCs CD1a+ epidérmicas tanto de piel lesional como no lesional de pacientes con psoriasis** comparada con la piel de sujetos sanos ( $p < 0,05$ ) (Fig.56B). Para descartar la expresión que podría darse en una subpoblación de células dendríticas inflamatorias epidérmicas (IDECs) que son CD1a+ y evaluar la expresión de gal-1 específicamente en LCs, se realizó inmunotinción triple (langerina, CD1a y gal-1) (Fig.57A). El análisis de la expresión de gal-1 mostró que **las LCs (langerina+ CD1a+) de pacientes con psoriasis tenían una expresión menor comparada con la de sujetos sanos** (Fig.57B). Los bajos niveles de gal-1 también se corroboraron además en lisados totales de biopsias de piel de 2 pacientes y de 2 donantes sanos por WB (Fig.57C).



**Figura 56: Las células epidérmicas de pacientes con psoriasis expresan niveles bajos de gal-1.** (A) Análisis de inmunofluorescencia de la expresión de gal-1 en cortes de piel de un sujeto sano y de un paciente con psoriasis. Se muestran los resultados de la doble inmunofluorescencia de CD1a (rojo) y de gal-1 (verde); las flechas marcan la expresión de gal-1 en las células CD1a+. (B) Cuantificación de la expresión de gal-1 en las células CD1a+. La intensidad de la señal de la gal-1 se midió en las células CD1a+ empleando el programa ImageJ. Los datos mostrados son las medias $\pm$ DE de la intensidad de fluorescencia de 4 pacientes con psoriasis y 4 controles sanos; fueron analizadas al menos 50 células por cada corte.



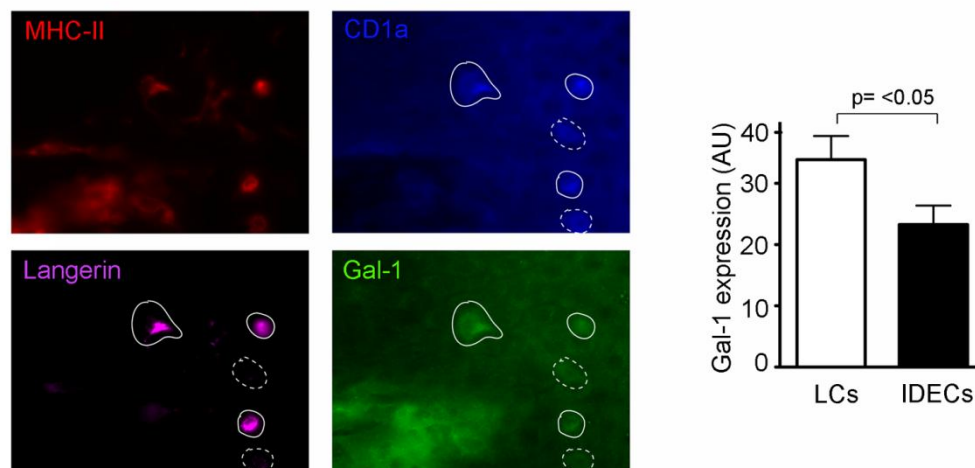
**Figura 57: Las células de Langerhans de pacientes con psoriasis expresan niveles bajos de gal-1.** (A) Análisis de inmunofluorescencia de la expresión de gal-1 en la piel de un sujeto sano y un paciente con psoriasis. Se muestra una triple inmunofluorescencia con CD1a (rojo), langerina (violeta) y gal-1 (verde); las flechas marcan la expresión de gal-1 en las LCs. (B) Cuantificación de la expresión de gal-1 en las células de Langerhans. La señal de intensidad de la gal-1 se midió en las células CD1a+ langerina+ empleando el programa ImageJ; los datos mostrados son la media  $\pm$ DE de la intensidad de fluorescencia de cuatro pacientes con psoriasis y cuatro controles sanos; se analizaron al menos 50 células por cada corte. (C) Expresión de la gal-1 en los lisados totales de las biopsias cutáneas de dos pacientes con psoriasis (una de piel lesional y otra de piel no lesional) y dos sujetos sanos. La expresión de vimentina se empleó como control de carga.

### *Expresión de gal-1 en IDECs y dDCs de la piel psoriásica*

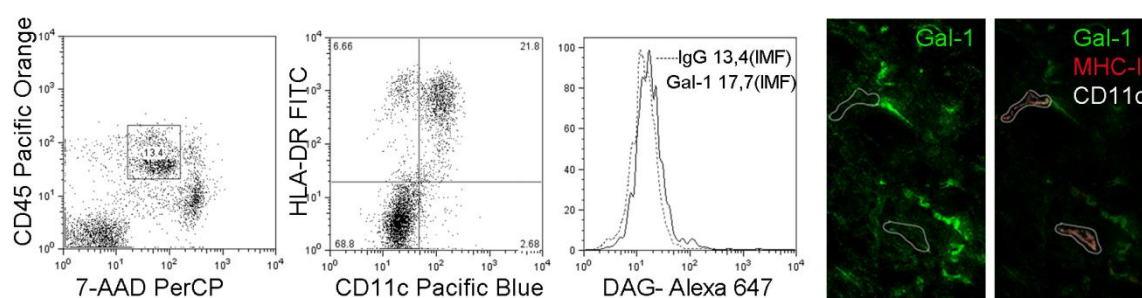
Debido a la baja expresión de gal-1 en las células CD1a+, analizamos si existían diferencias en la expresión de esta glectina entre las IDECs (CD1a+) y las LCs. El análisis de la expresión de gal-1 en la inmunotinción con 4 colores (CMH clase II, CD1a, langerina y gal-1) de la piel psoriásica lesional mostró que las **IDECs expresan niveles más bajos de gal-1 que las LCs** (Fig.58A). El análisis de la expresión de glectinas en las dDCs por **citometría de flujo** en las células aisladas de la piel de sujetos sanos mostró que estas células expresan **bajos niveles de gal-1 y gal-9** (Fig.58B). La **inmunotinción con 3 colores** (CMH clase-II, CD11c y gal-1) de las muestras de piel de pacientes con psoriasis y de sujetos sanos **corroboró la baja expresión de la gal-1 en las dDCs de sujetos sanos** (Fig.58B) y mostró que la expresión de esta glectina, ya de por sí baja en las dDCs, es aún menor en las muestras de piel lesional de los pacientes con psoriasis (Fig.59).



A

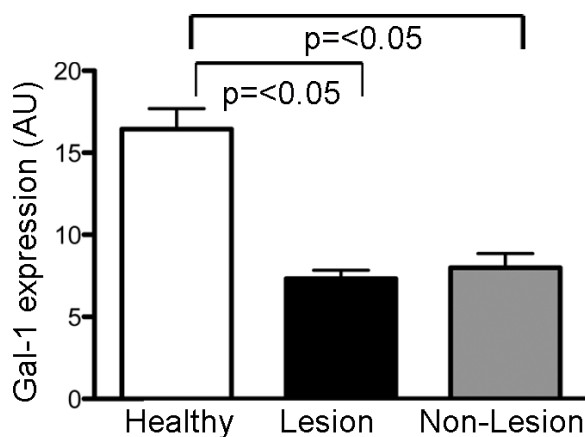


B



**Figura 58: Expresión de gal-1 en células dendríticas IDECs y dDCs.** (A) Inmunofluorescencia de 4 colores de la piel lesional de pacientes con psoriasis. Las muestras de piel fueron teñidas con anti-CMH-clase II, anti-CD1a, anti-langerina y anti-gal-1. La intensidad de la señal de la gal-1 se midió, como en la figura 3, en las células CMH-clase II+CD1a+Langerina+ (LCs) y en las células CMH-II+CD1a+Langerina- (IDECs). Las LCS están rodeadas por las líneas continuas y las IDECs por líneas discontinuas. (B) Análisis por citometría de flujo de la expresión de gal-1 en dDCs aisladas ex vivo de los cortes de dermis de piel normal. Los datos en el interior del histograma corresponden a la media de la intensidad de fluorescencia (IMF). En la esquina inferior derecha, se muestra la inmunofluorescencia de 3 colores de la piel de la biopsia de un sujeto sano teñida con anti-gal-1 (verde), anti-CMH-clase II (rojo) y anti-CD11c (blanco). En la imagen se remarcen las dDCs.





**Figura 59: Cuantificación de la expresión de gal-1 en las DCs dérmicas.** La intensidad de la señal de la gal-1 se midió en las células CD11c+ CMH-clasell+ empleando el programa ImageJ, en muestras de piel lesional y no lesional de pacientes con psoriasis y de sujetos sanos. Los datos son la media±DE de la intensidad de fluorescencia de 4 pacientes con psoriasis y 4 sujetos sanos.

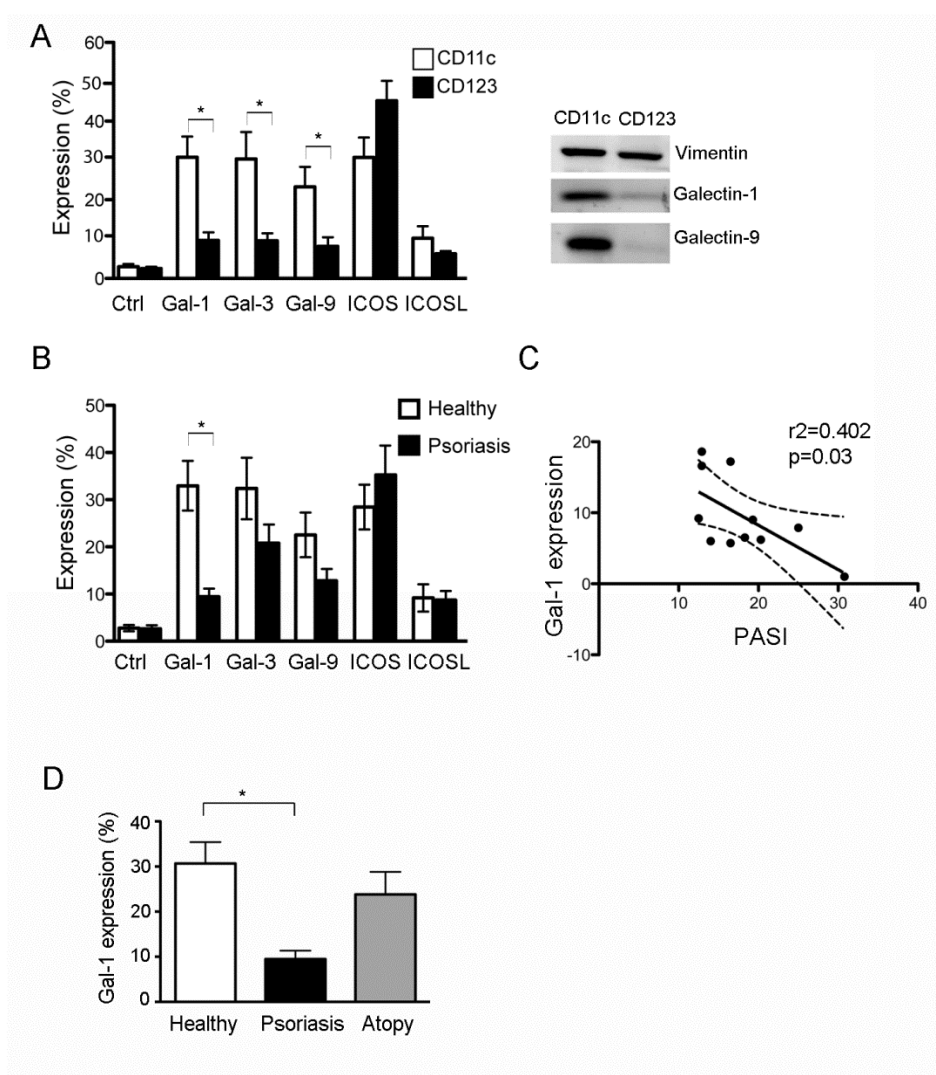
***Las galectinas están expresadas diferencialmente en los subtipos de DCs de sangre periférica y la expresión de gal-1 es defectuosa en las DCs de sangre periférica de pacientes con psoriasis***

El análisis por FACS de la expresión de galectinas en las DCs de sangre periférica de sujetos sanos mostró una **mayor expresión en superficie de la gal-1, gal-3 y gal-9 en mDCs comparada con pDCs** (Fig.60A). En contraposición, el estudio de otras moléculas inmunorreguladoras, como **ICOS e ICOSL no mostraron diferencias significativas** en su expresión.

La **elevada expresión de gal-1 y gal-9 en las mDCs** también fue detectada por WB en las mDCs y las pDCs purificadas de la sangre periférica mediante separación celular. Posteriormente, determinamos si la expresión de galectinas en mDCs de sangre periférica estaba afectada en la psoriasis. El análisis por citometría de flujo demostró una **expresión significativamente baja en las mDCs de pacientes con psoriasis** (Fig.60B). La expresión de gal-3 y gal-9 fue también ligeramente menor, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Los niveles de ICOS y de ICOSL eran similares en pacientes con psoriasis que en sujetos sanos. Para determinar si la expresión reducida de gal-1 también se observaba en otras enfermedades inflamatorias de la piel, se analizó la gal-1 en mDCs de sangre periférica de pacientes con dermatitis atópica. Nuestros resultados mostraron que **la expresión de gal-1 en los mDCs de pacientes atópicos era similar a la expresión observada en sujetos sanos** (Fig.60D).

### Análisis de correlación clínica

El análisis de correlación entre la actividad de la enfermedad (PASI) y la expresión de gal-1 en mDCs de sangre periférica mostró que los índices de actividad más elevados se asociaban con niveles más bajos de gal-1 (Figura 6C;  $r^2=-0,5662$ ,  $p=0,03$ ).



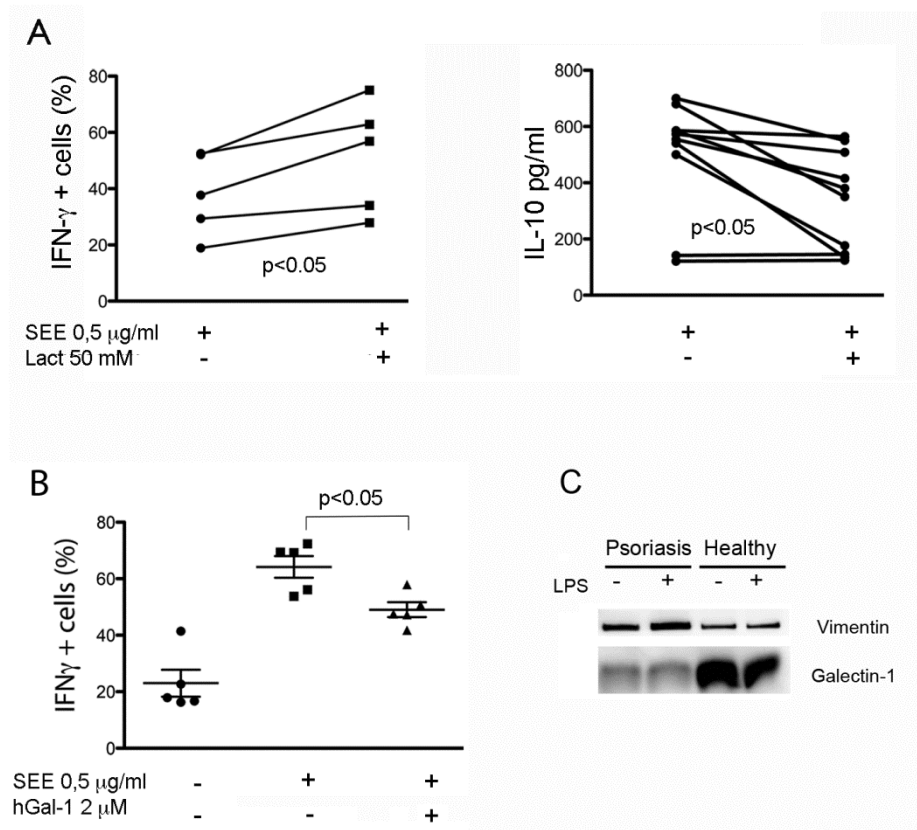
**Figura 60: Las DCs mieloides de sangre periférica de pacientes con psoriasis expresan niveles bajos de gal-1.** (A) La gal-1, gal-3 y gal-9 se expresan a niveles altos en las DCs CD11c+ comparadas con las DCs CD123+ obtenidas de sujetos sanos, evaluadas por citometría de flujo. Los datos mostrados son la media±EEM (error estándar de la media) de 14 experimentos independientes; la gal-1 y la gal-9 fueron determinadas en lisados totales de mDCs y pDCs aisladas de la sangre periférica mediante separación celular. (B) Expresión de moléculas reguladoras en las mDCs de pacientes con psoriasis y sujetos sanos. La expresión de proteínas se determinó en las DCs CD11c+ por citometría de flujo, como en (A); las barras representan la media±EEM de 12 pacientes con psoriasis y 14 sujetos sanos. (C) Correlación negativa de la expresión de gal-1 en las mDCs y la actividad de la enfermedad (PASI) en pacientes con psoriasis. La correlación entre la expresión de gal-1 y el PASI fue analizada por el test de Spearman. (D) Expresión de gal-1 en las mDCs de sujetos sanos (n=14), pacientes con

psoriasis (n=12) y pacientes con dermatitis atópica (n=6); las diferencias fueron analizadas con el test de Mann-Whitney, \*p<0,05.

***La inhibición de la unión de galectinas incrementa la producción de IFN-γ disminuye la producción de IL-10 por los linfocitos TCD4+***

Para confirmar que la gal-1 y la gal-9 actúan como reguladoras negativas de la respuesta inmune Th1, medimos la producción de IFN-γ e IL-10 en co-cultivos de linfocitos TCD4+ con moDCs humanos precargados con el superantígeno de la enterotoxina E estafilocócica (SEE) en presencia o ausencia de lactosa (50mM), que actúa como un inhibidor de la unión de galectinas. La tinción intracelular demostró que la inhibición de la unión de galectinas aumenta la producción de IFN-γ por los linfocitos TCD4+ (Fig.61A) e inhibe la producción de IL-10 inducida por SEE (Fig.61A).

Posteriormente, investigamos la capacidad de la gal-1 para regular la producción de IFN-γ en las células de pacientes con psoriasis. Las moDCs de pacientes con psoriasis fueron precargadas con SEE y co-cultivadas con PBLs autólogos. La gal-1 añadida exógenamente inhibió la producción de IFN-γ por los linfocitos T de pacientes con psoriasis (Fig.61B). El WB de los lisados totales de las moDCs de pacientes con psoriasis y sujetos sanos no tratadas o tratadas con LPS mostró que existe una **expresión menor de gal-1 en las células de las muestras de psoriasis** (Fig.61C).



**Figura 61: La gal-1 inhibe la producción de IFN $\gamma$  en pacientes con psoriasis.** (A) La inhibición de galectina -1 incrementa la expresión de IFN $\gamma$  y disminuye la producción de IL-10. Las moDCs precargadas con SEE y los linfocitos TCD4 $^{+}$  alogénicos, ambos de sujetos sanos, fueron co-cultivados durante 5 días en presencia o ausencia de lactosa (50mM) y los niveles intracelulares de IFN $\gamma$  (n=5) y la producción de IL-10 (n=10) fueron determinados por citometría de flujo y ELISA respectivamente. Las diferencias entre los tratamientos fueron analizadas por t-test pareados. (B) La gal-1 inhibe parcialmente la producción de IFN $\gamma$  por los LT de pacientes con psoriasis. Las moDCs precargadas con SEE y los LT autólogos de pacientes con psoriasis fueron co-cultivados durante 5 días con o sin gal-1 2 $\mu$ M, y se determinaron los niveles de IFN $\gamma$  en los linfocitos T CD4 $^{+}$  por citometría de flujo. Se muestran los resultados de 5 pacientes; las diferencias entre los tratamientos fueron analizadas por el test de Kruskal-Wallis. (C) Se muestra la expresión de gal-1 en lisados totales de moDCs, una de un paciente con psoriasis y otra de un sujeto sano. Las moDCs a los 7 días, con o sin LPS, fueron lisadas y cargadas en un gel de poliacrílammida al 12%.

## 6.4 DISCUSIÓN

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel cuyas manifestaciones están orquestadas fundamentalmente por linfocitos T CD4 $^{+}$  proinflamatorios que producen tanto citocinas Th1 como Th17 [164, 171]. Un gran conjunto de evidencias han establecido una función clave de las DCs en la iniciación y el mantenimiento de la psoriasis [72, 169]. En nuestro estudio, mostramos que las **células de Langerhans y las DCs mieloides de sangre periférica de pacientes con psoriasis expresan niveles bajos de gal-1.**

Asimismo, la **gal-1** tiene la capacidad de reducir la secreción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos de estos pacientes. La respuesta inmune exacerbada que se observa en la psoriasis y otras enfermedades inflamatorias se basa fundamentalmente en el estudio de la sobreexpresión de moléculas pro-inflamatorias. Diversas variantes genéticas identificadas en pacientes con psoriasis están localizadas en genes que codifican para reguladores negativos de la activación de células del sistema inmune. De hecho, varios de los componentes de las vías que están involucrados en la activación de los LT son dianas conocidas de terapias para psoriasis, tales como los anti-TNF-alfa, anti-LFA-1, anti-LFA-3 y más recientemente anti-IL-12/IL-23 [164, 277]. Sin embargo, existen pocos datos disponibles en humanos sobre las interacciones de los linfocitos T con las células dendríticas, un proceso crítico para la iniciación de la respuesta inmune en pacientes con psoriasis, así como de moléculas con actividad reguladora negativa sobre el sistema inmune.

Las **galectinas**, como ya hemos señalado, están implicadas en la **regulación negativa de la respuesta inmune**, participando en procesos tales como la proliferación de las células inmunes [278], apoptosis [199], adhesión celular y migración [279-281] y la modulación de las interacciones entre los LT y las células presentadoras de antígeno (CPAs) [282].

Las **DCs** son participantes fundamentales en los mecanismos inmunes; la activación y función anormales de estas DCs se asocian con múltiples enfermedades inflamatorias crónicas, incluyendo la psoriasis [165]. A pesar de la importancia de las galectinas en la regulación de la respuesta inmune, hay muy pocos estudios de sus funciones en las DCs primarias humanas. Con respecto a la influencia de las galectinas sobre la función de las DCs se ha descrito la **capacidad de la galectina exógena para aumentar la secreción de citoquinas pro-inflamatorias por las DCs y de influir en su migración a través de la matriz extracelular** [283]. Para estudiar la función inmunorreguladora de la gal-1, gal-3 y gal-9 en psoriasis, hemos examinado su expresión en las DCs de la piel. El presente estudio muestra que las DCs primarias humanas de la piel expresan gal-1, gal-3 y gal-9 en su superficie celular. Más aún, detectamos expresión diferencial de gal-1 y gal-9 en las DCs mieloides y plasmacitoides de sangre periférica. Aunque serían necesarios estudios adicionales, **la expresión diferencial de gal-1 y gal-9 podría explicar diferentes funciones en estas células**. Con respecto a la expresión de otras lectinas en la piel, la **galectina-1 se detectó a un nivel muy alto en la piel lesional**, resultado que concuerda con una publicación previa [284].

La función de la gal-1 endógena en las DCs ha sido estudiada recientemente en un modelo de ratón de encefalomiелitis. La gal-1, tanto aportada exógenamente como regulada de forma endógena, en este modelo condujo a la diferenciación de las DCs hacia una función reguladora, promoviendo la tolerancia inmune de los linfocitos T [244] [201]. La **mayor evidencia científica** que apunta a la **gal-1** como un **regulador negativo** de la respuesta inmune se ha recogido en **modelos animales** de enfermedades inflamatorias, y los **estudios en humanos son muy escasos** comparativamente. **Aquí, demostramos que los pacientes con psoriasis tienen una baja expresión de gal-1 en las DCs mieloides de sangre periférica y en las LCs de piel lesional y no lesional que, junto a los estudios previos en modelos animales [201], indican un papel importante de la gal-1 en la inmunopatogenia de la psoriasis. La función positiva de la gal-1 en la producción de IL-10 se ha propuesto como uno de los mecanismos implicados en la inhibición de las respuestas Th1 y Th17 [201, 285, 286]. Nuestros resultados son consistentes con esta noción y muestran que el bloqueo de la unión de galectina reduce los niveles de IL-10 durante la presentación de antígeno. Junto a la baja expresión de IL-10 observada en la piel psoriásica, estos resultados indican que, defectos en la expresión de gal-1 por las DCs puede promover la respuesta inmune Th1 y Th17, probablemente mediante el control de la expresión de IL-10.**

Los experimentos de co-cultivos mostraron que la inhibición de la galectina incrementa la producción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en respuesta a la presentación de antígeno por las DCs, sugiriendo que las **galectinas también regulan la producción de citocinas proinflamatorias**. Resulta interesante que la producción de IFN- $\gamma$  disminuyó tras añadir gal-1 recombinante a co-cultivos autólogos de PBLs con moDCs de pacientes con psoriasis. **Los efectos de la gal-1 en los linfocitos T presumiblemente son debidos a la interferencia en su unión a glicoproteínas de la superficie celular de estas células.** Un importante número de glicoproteínas de linfocitos T, incluyendo CD2, CD3, CD7, CD45 y CD43, se ha visto que actúan como receptores para la unión de gal-1 y que están implicadas en la muerte de LT mediada por gal-1 [287]. Sin embargo, **la ausencia de la inducción de apoptosis a las dosis empleadas en nuestros experimentos sugiere un mecanismo no apoptótico y una participación de la gal-1 en los LT activados, no descrita aún.** Se sabe, no obstante, que la gal-1 es capaz de modular la secreción de TNF $\alpha$  y de IFN $\gamma$  sin afectar a la viabilidad de la célula [205]. **La función de las galectinas en la patogénesis de la psoriasis también podría deberse a sus efectos en otros tipos**



**celulares.** A este respecto, está descrito que **la gal-1 inhibe la migración de los queratinocitos en un modelo de curación de heridas** [288].

Las células dendríticas son importantes para la inducción, no sólo de la inmunidad por los LT sino también de la tolerancia inmune. En el mantenimiento de la tolerancia periférica se han propuesto a las LCs que migran a los ganglios linfáticos de drenaje durante el estado de quiescencia. Los medios por los cuales las DCs confieren tolerancia no están totalmente esclarecidos, pero implican la secreción de citocinas supresoras, tales como la IL-10, y la inducción de linfocitos reguladores. **La expresión de subtipos específicos de las galectinas en las LCs y las DCs mieloides de sangre periférica podrían desempeñar una importante función en la fisiología de estas células.**

En resumen, nuestros datos son consistentes con un **modelo en el que la expresión de galectina-1 limita las respuestas inflamatorias de la piel y sugiere que la disminución de la expresión de gal-1 en las DCs humanas puede contribuir a la exacerbación de la respuesta inflamatoria observada en la psoriasis.** El reconocimiento aumentado de las galectinas como moléculas inmunorreguladoras podría dirigirnos hacia nuevos acercamientos terapéuticos para restaurar el equilibrio inmune que se ha perdido en la psoriasis.

## 7. VALORACIÓN GLOBAL

Teniendo en cuenta la exposición anterior, nuestro trabajo parte del estudio de la respuesta génica de las células cutáneas en cultivos primarios a uno de los agentes estresantes más constantes para la piel, como es la RUV. Las investigaciones previas en cultivos de KCs y MCs son más numerosas, en parte debido a la facilidad de obtención de las mismas si la comparamos con la extracción de DCs o moDCs. Por eso consideramos más interesante centrarnos en el estudio de estas últimas. La modulación de los genes, tanto en el sentido de activación como de represión de su expresión siempre nos abre un nuevo camino para ahondar en moléculas menos estudiadas y que pudieran tener valor en la patogenia de enfermedades y, por ende, en su tratamiento. En nuestro caso, además de disponer del estudio del genoma humano completo con un acercamiento experimental muy restrictivo, el análisis de enriquecimiento posterior, permitió sacar a la luz otros genes que, de otra manera hubieran quedado ocultos y que resultan muy importantes en los fenómenos de inmunomodulación. Esto último nos llevó a la elección de aquéllos grupos de genes menos estudiados y que tienen interés en la regulación negativa de la respuesta inmunológica.

Cuando nos planteamos llevar las conclusiones del primer trabajo al estudio en pacientes dermatológicos, la psoriasis fue la patología elegida. Entre otros motivos, los fundamentales fueron: el estado de activación de la respuesta inmune, el protagonismo que posee la DC en su patogenia, la mejoría de la enfermedad con RUV y la necesidad de obtener nuevas dianas terapéuticas en una enfermedad multisistémica tan prevalente. En el diseño del estudio, tuvimos en cuenta que, la piel sana de pacientes psoriásicos con un grado de afectación moderado-grave, podría encontrarse en un estado “pro-inflamatorio” en comparación con la piel de un sujeto sano; por este motivo, las muestras no sólo se obtuvieron de piel psoriásica o perilesional, sino de piel sana distante. Además, como se trataba de pacientes con afectación moderada-grave, intuíamos que, en sangre periférica también podríamos encontrar manifestaciones de este estado inflamatorio en los pacientes psoriásicos. El hallazgo más importante fue la disminución de la galectina-1 en piel psoriásica, tanto lesional como no lesional y, más concretamente en las DCs de epidermis, dermis y en las DCs mieloides de sangre periférica. Si consideramos la posible trascendencia clínica de nuestro estudio, por una parte, la potenciación de esta galectina-1 podría suponer un arma en el tratamiento de la psoriasis y, de manera más hipotética, constituir una herramienta para la medición objetiva de la afectación cutánea y sistémica de la enfermedad.

## 8. CONCLUSIONES

1. Hay varios genes expresados diferencialmente en las células dendríticas en respuesta a la radiación ultravioleta que intervienen en la regulación de la respuesta inmune: el ligando coestimulador inducible (ICOSL), IL1, trombospondina-1 (THBS1), IL10, GADD45A, GADD45B, Galectina 1, Galectina 3, SLA, CXCR4, SOCS1, PTPE, CCR7, e IL12A.
2. La radiación ultravioleta induce varios genes implicados en daño al ADN y respuesta al estrés en células dendríticas, queratinocitos y melanocitos: FDXR, PCNA, PLK2 y GADD45A.
3. La radiación ultravioleta provoca una disminución de la expresión de Gal-1 y Gal-3 en células dendríticas humanas en contraste con los melanocitos que presentan un importante incremento en la expresión de ambas.
4. A nivel de proteína, la exposición de las células dendríticas humanas a la radiación ultravioleta muestra una clara disminución de la expresión de Gal1, Gal3, SLA, PTPE, ICOSL y SOCS1 y una inducción de GADD45a y THBS1 comparadas con células dendríticas no radiadas.
5. Los pacientes con psoriasis tienen una baja expresión de gal-1 en las células dendríticas mieloides de sangre periférica y en las células de Langerhans de piel lesional y no lesional, lo que indica una función importante de la gal-1 en la inmunopatogenia de la psoriasis.
6. El análisis de correlación entre el PASI y la expresión de gal-1 en células dendríticas mieloides muestra que los índices de actividad más elevados se asocian con niveles más bajos de gal-1.
7. La inhibición de la unión de gal-1 incrementa la producción de IFN- $\gamma$  disminuye la producción de IL-10 por los linfocitos TCD4+. Por lo tanto, los defectos en la expresión de gal-1 por las células dendríticas puede promover la respuesta inmune Th1 y Th17, probablemente mediante el control de esta expresión de IL-10.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Streilein, J.W., *Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions*. J Invest Dermatol, 1983. **80 Suppl**: p. 12s-16s.
2. Nestle, F.O., et al., *Skin immune sentinels in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(10): p. 679-91.
3. Wessells, H., et al., *Transcriptional profiling of human cavernosal endothelial cells reveals distinctive cell adhesion phenotype and role for claudin 11 in vascular barrier function*. Physiol Genomics, 2009. **39**(2): p. 100-8.
4. Kim, B.S., et al., *Keratinocytes function as accessory cells for presentation of endogenous antigen expressed in the epidermis*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(12): p. 2805-17.
5. Feldmeyer, L., et al., *The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes*. Curr Biol, 2007. **17**(13): p. 1140-5.
6. Guillemins, M., et al., *From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets*. Eur J Immunol, 2010. **40**(8): p. 2089-94.
7. O'Doherty, U., et al., *Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature*. Immunology, 1994. **82**(3): p. 487-93.
8. Chu, C.S., et al., *Phase I/II randomized trial of dendritic cell vaccination with or without cyclophosphamide for consolidation therapy of advanced ovarian cancer in first or second remission*. Cancer Immunol Immunother, 2011.
9. Lin, C.C., et al., *A novel adjuvant Ling Zhi-8 enhances the efficacy of DNA cancer vaccine by activating dendritic cells*. Cancer Immunol Immunother, 2011. **60**(7): p. 1019-27.
10. Zitvogel, L., S. Amigorena, and J.L. Teillaud, [About Ralph M. Steinman and dendritic cells]. Med Sci (Paris), 2011. **27**(11): p. 1028-34.
11. Reulen, J.P., et al., *Computerised eye-movement processor for clinical applications: basic considerations and design*. Med Biol Eng Comput, 1986. **24**(2): p. 209-15.
12. Steinman, R.M. and J. Banchereau, *Taking dendritic cells into medicine*. Nature, 2007. **449**(7161): p. 419-26.
13. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
14. Mangan, P.R., et al., *Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 231-4.
15. Reichardt, P., et al., *Naive B cells generate regulatory T cells in the presence of a mature immunologic synapse*. Blood, 2007. **110**(5): p. 1519-29.
16. Stoitzner, P., et al., *Langerhans cells cross-present antigen derived from skin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(20): p. 7783-8.
17. Morelli, A.E. and A.W. Thomson, *Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(8): p. 610-21.
18. Wallet, M.A., P. Sen, and R. Tisch, *Immunoregulation of dendritic cells*. Clin Med Res, 2005. **3**(3): p. 166-75.
19. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 685-711.
20. Dhodapkar, M.V., et al., *Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells*. J Exp Med, 2001. **193**(2): p. 233-8.
21. Jonuleit, H., et al., *Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells*. J Exp Med, 2000. **192**(9): p. 1213-22.

22. Cella, M., et al., *A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing.* J Exp Med, 1997. **185**(10): p. 1743-51.
23. Johnson, D.J. and P.S. Ohashi, *Molecular programming of steady-state dendritic cells: impact on autoimmunity and tumor immune surveillance.* Ann N Y Acad Sci, 2013. **1284**: p. 46-51.
24. Chang, C.C., et al., *Ig-like transcript 3 regulates expression of proinflammatory cytokines and migration of activated T cells.* J Immunol, 2009. **182**(9): p. 5208-16.
25. Fallarino, F., et al., *Murine plasmacytoid dendritic cells initiate the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in response to CD200 receptor engagement.* J Immunol, 2004. **173**(6): p. 3748-54.
26. Ma, A. and B.A. Malynn, *A20: linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease.* Nat Rev Immunol, 2012. **12**(11): p. 774-85.
27. Jakubzick, C., et al., *Lymph-migrating, tissue-derived dendritic cells are minor constituents within steady-state lymph nodes.* J Exp Med, 2008. **205**(12): p. 2839-50.
28. Saeland, S., et al., *Distribution of surface-membrane molecules on bone marrow and cord blood CD34+ hematopoietic cells.* Exp Hematol, 1992. **20**(1): p. 24-33.
29. Ebert, L.M., P. Schaerli, and B. Moser, *Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues.* Mol Immunol, 2005. **42**(7): p. 799-809.
30. Schroder, J.M., et al., *Who is really in control of skin immunity under physiological circumstances - lymphocytes, dendritic cells or keratinocytes?* Exp Dermatol, 2006. **15**(11): p. 913-29.
31. Gros, E., et al., *Expression of chemokines and chemokine receptors in lesional and nonlesional upper skin of patients with atopic dermatitis.* J Allergy Clin Immunol, 2009. **124**(4): p. 753-60 e1.
32. Ginhoux, F., et al., *Langerhans cells arise from monocytes in vivo.* Nat Immunol, 2006. **7**(3): p. 265-73.
33. Gobel, F., et al., *Reciprocal role of GATA-1 and vitamin D receptor in human myeloid dendritic cell differentiation.* Blood, 2009. **114**(18): p. 3813-21.
34. Valladeau, J., et al., *Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules.* Immunity, 2000. **12**(1): p. 71-81.
35. Angel, C.E., et al., *CD14+ antigen-presenting cells in human dermis are less mature than their CD1a+ counterparts.* Int Immunol, 2007. **19**(11): p. 1271-9.
36. Krieger, S.E., et al., *Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations.* Hepatology. **51**(4): p. 1144-57.
37. Stoecklinger, A., et al., *Langerin+ dermal dendritic cells are critical for CD8+ T cell activation and IgH gamma-1 class switching in response to gene gun vaccines.* J Immunol. **186**(3): p. 1377-83.
38. Caux, C., et al., *GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells.* Nature, 1992. **360**(6401): p. 258-61.
39. Schaerli, P., et al., *Cutaneous CXCL14 targets blood precursors to epidermal niches for Langerhans cell differentiation.* Immunity, 2005. **23**(3): p. 331-42.
40. Geissmann, F., et al., *Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells.* J Exp Med, 1998. **187**(6): p. 961-6.
41. Larregina, A.T., et al., *Dermal-resident CD14+ cells differentiate into Langerhans cells.* Nat Immunol, 2001. **2**(12): p. 1151-8.



42. Jonuleit, H., et al., *Efficient transduction of mature CD83+ dendritic cells using recombinant adenovirus suppressed T cell stimulatory capacity*. Gene Ther, 2000. **7**(3): p. 249-54.
43. Adare, A., et al., *Measurement of bottom versus charm as a function of transverse momentum with electron-hadron correlations in p + p collisions at square root of s = 200 GeV*. Phys Rev Lett, 2009. **103**(8): p. 082002.
44. de Groot, A.C., et al., *Contact allergy to preservatives (I)*. Contact Dermatitis, 1986. **14**(2): p. 120-2.
45. Roh, S., et al., *Porcine nuclear transfer using somatic donor cells altered to express male germ cell function*. Reprod Fertil Dev, 2009. **21**(7): p. 882-91.
46. Lenz, A., et al., *Human and murine dermis contain dendritic cells. Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization*. J Clin Invest, 1993. **92**(6): p. 2587-96.
47. Nestle, F.O., et al., *Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets*. J Immunol, 1993. **151**(11): p. 6535-45.
48. Rajasalu, T., et al., *Deficiency in B7-H1 (PD-L1)/PD-1 coinhibition triggers pancreatic beta-cell destruction by insulin-specific, murine CD8 T-cells*. Diabetes. **59**(8): p. 1966-73.
49. Zaba, L.C., et al., *Normal human dermis contains distinct populations of CD11c+BDCA-1+ dendritic cells and CD163+FXIIIa+ macrophages*. J Clin Invest, 2007. **117**(9): p. 2517-25.
50. Zaba, L.C., J.G. Krueger, and M.A. Lowes, *Resident and "inflammatory" dendritic cells in human skin*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(2): p. 302-8.
51. Han, C., et al., *Adiposity parameters and cognitive function in the elderly: application of "Jolly Fat" hypothesis to cognition*. Arch Gerontol Geriatr, 2009. **49**(2): p. e133-8.
52. Nestle, F.O. and B.J. Nickoloff, *Deepening our understanding of immune sentinels in the skin*. J Clin Invest, 2007. **117**(9): p. 2382-5.
53. Klechevsky, E., et al., *Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells*. Immunity, 2008. **29**(3): p. 497-510.
54. Klechevsky, E., et al., *Antitumor activity of immunotoxins with T-cell receptor-like specificity against human melanoma xenografts*. Cancer Res, 2008. **68**(15): p. 6360-7.
55. Tassaneetrithep, B., et al., *DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells*. J Exp Med, 2003. **197**(7): p. 823-9.
56. Fujii, S., et al., *Detection and activation of human Valpha24+ natural killer T cells using alpha-galactosyl ceramide-pulsed dendritic cells*. J Immunol Methods, 2003. **272**(1-2): p. 147-59.
57. Muller, G., et al., *Fetal calf serum-free generation of functionally active murine dendritic cells suitable for in vivo therapeutic approaches*. J Invest Dermatol, 2000. **114**(1): p. 142-9.
58. Gilliet, M., W. Cao, and Y.J. Liu, *Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(8): p. 594-606.
59. Schuler-Thurner, B., et al., *Mage-3 and influenza-matrix peptide-specific cytotoxic T cells are inducible in terminal stage HLA-A2.1+ melanoma patients by mature monocyte-derived dendritic cells*. J Immunol, 2000. **165**(6): p. 3492-6.
60. Charles, J., et al., *Plasmacytoid dendritic cells and dermatological disorders: focus on their role in autoimmunity and cancer*. Eur J Dermatol, 2010. **20**(1): p. 16-23.
61. Jenne, L., et al., *Dendritic cells containing apoptotic melanoma cells prime human CD8+ T cells for efficient tumor cell lysis*. Cancer Res, 2000. **60**(16): p. 4446-52.



62. Albanesi, C., et al., *Chemerin expression marks early psoriatic skin lesions and correlates with plasmacytoid dendritic cell recruitment*. J Exp Med, 2009. **206**(1): p. 249-58.
63. Albanesi, C., et al., *Immune functions and recruitment of plasmacytoid dendritic cells in psoriasis*. Autoimmunity, 2010. **43**(3): p. 215-9.
64. Nakajima, H., et al., *Circulating level of chemerin is upregulated in psoriasis*. J Dermatol Sci, 2010. **60**(1): p. 45-7.
65. Loser, K. and S. Beissert, *Dendritic cells and T cells in the regulation of cutaneous immunity*. Adv Dermatol, 2007. **23**: p. 307-33.
66. Loeser, S., et al., *Spontaneous tumor rejection by cbl-b-deficient CD8+ T cells*. J Exp Med, 2007. **204**(4): p. 879-91.
67. Ganguly, D., et al., *Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8*. J Exp Med, 2009. **206**(9): p. 1983-94.
68. Schakel, K., et al., *6-Sulfo LacNAc, a novel carbohydrate modification of PSGL-1, defines an inflammatory type of human dendritic cells*. Immunity, 2002. **17**(3): p. 289-301.
69. Wehner, R., et al., *Mesenchymal stem cells efficiently inhibit the proinflammatory properties of 6-sulfo LacNAc dendritic cells*. Haematologica, 2009. **94**(8): p. 1151-6.
70. Costantini, C., et al., *Human neutrophils interact with both 6-sulfo LacNAc+ DC and NK cells to amplify NK-derived IFN{gamma}: role of CD18, ICAM-1, and ICAM-3*. Blood, 2011. **117**(5): p. 1677-86.
71. Serbina, N.V., et al., *TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 59-70.
72. Lowes, M.A., et al., *Increase in TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(52): p. 19057-62.
73. Zaba, L.C., et al., *Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(1): p. 79-88.
74. Nestle, F.O., D.H. Kaplan, and J. Barker, *Psoriasis*. N Engl J Med, 2009. **361**(5): p. 496-509.
75. Haniffa, M., et al., *Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation*. J Exp Med, 2009. **206**(2): p. 371-85.
76. Ward, C., et al., *Bronchial epithelial cells cultured from clinically stable lung allograft patients promote the development of macrophages from monocytes rather than dendritic cells*. Thorax, 2009. **64**(5): p. 430-5.
77. van der Leij, J., et al., *Dimeric galectin-1 induces IL-10 production in T-lymphocytes: an important tool in the regulation of the immune response*. J Pathol, 2004. **204**(5): p. 511-8.
78. Haniffa, M.A., et al., *Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes?* Haematologica, 2009. **94**(2): p. 258-63.
79. Taylor, D.K., et al., *Guidelines for dosimetry and calibration in ultraviolet radiation therapy: a report of a British Photodermatology Group workshop*. Br J Dermatol, 2002. **146**(5): p. 755-63.
80. Perdiz, D., et al., *Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis*. J Biol Chem, 2000. **275**(35): p. 26732-42.
81. Klechevsky, E., et al., *Understanding human myeloid dendritic cell subsets for the rational design of novel vaccines*. Hum Immunol, 2009. **70**(5): p. 281-8.

82. Albanesi, C., et al., *Keratinocytes in inflammatory skin diseases*. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005. **4**(3): p. 329-34.
83. Luci, C., et al., *Influence of the transcription factor RORgammat on the development of NKp46+ cell populations in gut and skin*. Nat Immunol, 2009. **10**(1): p. 75-82.
84. Schroder, J.M. and J. Harder, *Human beta-defensin-2*. Int J Biochem Cell Biol, 1999. **31**(6): p. 645-51.
85. Yang, D., et al., *Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6*. Science, 1999. **286**(5439): p. 525-8.
86. Lagishetty, V., et al., *1alpha-hydroxylase and innate immune responses to 25-hydroxyvitamin D in colonic cell lines*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2010. **121**(1-2): p. 228-33.
87. Pines, A., et al., *Differential activity of UV-DDB in mouse keratinocytes and fibroblasts: impact on DNA repair and UV-induced skin cancer*. DNA Repair (Amst), 2009. **8**(2): p. 153-61.
88. Scott, N.M., et al., *Differences in control by UV radiation of inflammatory airways disease in naive and allergen pre-sensitised mice*. Photochem Photobiol Sci, 2011. **10**(12): p. 1894-901.
89. Keller, M., et al., *Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion*. Cell, 2008. **132**(5): p. 818-31.
90. Diffey, B.L., *Sources and measurement of ultraviolet radiation*. Methods, 2002. **28**(1): p. 4-13.
91. Vasta, G.R., *Galectins as pattern recognition receptors: structure, function, and evolution*. Adv Exp Med Biol, 2012. **946**: p. 21-36.
92. Schwarz, T. and A. Schwarz, *Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced immunosuppression*. Eur J Cell Biol, 2011. **90**(6-7): p. 560-4.
93. Vasta, G.R., et al., *Galectins as self/non-self recognition receptors in innate and adaptive immunity: an unresolved paradox*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 199.
94. Cooper, D., et al., *Multiple functional targets of the immunoregulatory activity of galectin-1: Control of immune cell trafficking, dendritic cell physiology, and T-cell fate*. Methods Enzymol, 2010. **480**: p. 199-244.
95. Toscano, M.A., et al., *Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death*. Nat Immunol, 2007. **8**(8): p. 825-34.
96. Liu, C.J., et al., *Keratinocyte growth factor (KGF) gene therapy mediated by an attenuated form of Salmonella typhimurium ameliorates radiation induced pulmonary injury in rats*. J Radiat Res, 2011. **52**(2): p. 176-84.
97. Uchi, H., et al., *Cytokines and chemokines in the epidermis*. J Dermatol Sci, 2000. **24 Suppl 1**: p. S29-38.
98. Ha, J.H. and S.D. Ha, *Synergistic effects of sodium hypochlorite and ultraviolet radiation in reducing the levels of selected foodborne pathogenic bacteria*. Foodborne Pathog Dis, 2011. **8**(5): p. 587-91.
99. Tobin, D.J. and J.C. Bystry, *Different populations of melanocytes are present in hair follicles and epidermis*. Pigment Cell Res, 1996. **9**(6): p. 304-10.
100. Orlow, S.J., *Congenital disorders of hypopigmentation*. Semin Dermatol, 1995. **14**(1): p. 27-32.
101. Plonka, P.M., et al., *What are melanocytes really doing all day long...?* Exp Dermatol, 2009. **18**(9): p. 799-819.
102. Byers, H.R., et al., *Role of cytoplasmic dynein in perinuclear aggregation of phagocytosed melanosomes and supranuclear melanin cap formation in human keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2003. **121**(4): p. 813-20.
103. Fitzpatrick, T.B. and A.S. Breathnach, *[the Epidermal Melanin Unit System]*. Dermatol Wochenschr, 1963. **147**: p. 481-9.

104. Jimbow, K., et al., *Some aspects of melanin biology: 1950-1975*. J Invest Dermatol, 1976. **67**(1): p. 72-89.
105. Nordlund, J.J., *The melanocyte and the epidermal melanin unit: an expanded concept*. Dermatol Clin, 2007. **25**(3): p. 271-81, vii.
106. Cerdan, D., et al., *Human keratinocyte membrane lectins: characterization and modulation of their expression by cytokines*. Biol Cell, 1991. **73**(1): p. 35-42.
107. Minwalla, L., et al., *Keratinocytes play a role in regulating distribution patterns of recipient melanosomes in vitro*. J Invest Dermatol, 2001. **117**(2): p. 341-7.
108. Condaminet, B., et al., *Ultraviolet rays induced expression of lectins on the surface of a squamous carcinoma keratinocyte cell line*. Exp Cell Res, 1997. **232**(2): p. 216-24.
109. Greatens, A., et al., *Effective inhibition of melanosome transfer to keratinocytes by lectins and niacinamide is reversible*. Exp Dermatol, 2005. **14**(7): p. 498-508.
110. Cardinali, G., D. Kovacs, and M. Picardo, *Mechanisms underlying post-inflammatory hyperpigmentation: lessons from solar lentigo*. Ann Dermatol Venereol, 2012. **139 Suppl 4**: p. S148-52.
111. Slominski, A., et al., *Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation*. Physiol Rev, 2004. **84**(4): p. 1155-228.
112. Slominski, A., *Neuroendocrine activity of the melanocyte*. Exp Dermatol, 2009. **18**(9): p. 760-3.
113. Friedmann, P.S. and B.A. Gilchrest, *Ultraviolet radiation directly induces pigment production by cultured human melanocytes*. J Cell Physiol, 1987. **133**(1): p. 88-94.
114. Abdel-Malek, Z., et al., *Analysis of the UV-induced melanogenesis and growth arrest of human melanocytes*. Pigment Cell Res, 1994. **7**(5): p. 326-32.
115. Le Poole, I.C., et al., *A novel, antigen-presenting function of melanocytes and its possible relationship to hypopigmentary disorders*. J Immunol, 1993. **151**(12): p. 7284-92.
116. Smit, N., et al., *Expression of different immunological markers by cultured human melanocytes*. Arch Dermatol Res, 1993. **285**(6): p. 356-65.
117. Mackintosh, J.A., *The antimicrobial properties of melanocytes, melanosomes and melanin and the evolution of black skin*. J Theor Biol, 2001. **211**(2): p. 101-13.
118. Ahn, J.H., S.H. Jin, and H.Y. Kang, *LPS induces melanogenesis through p38 MAPK activation in human melanocytes*. Arch Dermatol Res, 2008. **300**(6): p. 325-9.
119. Yu, N., et al., *Cultured human melanocytes express functional toll-like receptors 2-4, 7 and 9*. J Dermatol Sci, 2009. **56**(2): p. 113-20.
120. Swope, V.B., et al., *Synthesis of interleukin-1 alpha and beta by normal human melanocytes*. J Invest Dermatol, 1994. **102**(5): p. 749-53.
121. Zachariae, C.O., K. Thestrup-Pedersen, and K. Matsushima, *Expression and secretion of leukocyte chemotactic cytokines by normal human melanocytes and melanoma cells*. J Invest Dermatol, 1991. **97**(3): p. 593-9.
122. Le Poole, I.C. and S.T. Boyce, *Keratinocytes suppress transforming growth factor-beta1 expression by fibroblasts in cultured skin substitutes*. Br J Dermatol, 1999. **140**(3): p. 409-16.
123. Swope, V.B., et al., *Interleukins 1 alpha and 6 and tumor necrosis factor-alpha are paracrine inhibitors of human melanocyte proliferation and melanogenesis*. J Invest Dermatol, 1991. **96**(2): p. 180-5.
124. Shang, J., et al., *Effects of UVA and L-ascorbic acid on nuclear factor-kappa B in melanocytes and in HaCaT keratinocytes*. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 2002. **15**(5): p. 353-9.
125. Maverakis, E., et al., *Light, including ultraviolet*. J Autoimmun, 2010. **34**(3): p. J247-57.

126. Chacon-Salinas, R., et al., *An essential role for platelet-activating factor in activating mast cell migration following ultraviolet irradiation*. J Leukoc Biol, 2014. **95**(1): p. 139-48.
127. Heck, D.E., et al., *Solar ultraviolet radiation as a trigger of cell signal transduction*. Toxicol Appl Pharmacol, 2004. **195**(3): p. 288-97.
128. Lo, H.L., et al., *Differential biologic effects of CPD and 6-4PP UV-induced DNA damage on the induction of apoptosis and cell-cycle arrest*. BMC Cancer, 2005. **5**: p. 135.
129. Auriemma, M., et al., *alpha-MSH-stimulated tolerogenic dendritic cells induce functional regulatory T cells and ameliorate ongoing skin inflammation*. J Invest Dermatol, 2012. **132**(7): p. 1814-24.
130. Walker, S.L. and A.R. Young, *An action spectrum (290-320 nm) for TNFalpha protein in human skin in vivo suggests that basal-layer epidermal DNA is the chromophore*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(48): p. 19051-4.
131. Kaneko, K., et al., *cis-Urocanic acid initiates gene transcription in primary human keratinocytes*. J Immunol, 2008. **181**(1): p. 217-24.
132. Clydesdale, G.J., G.W. Dandie, and H.K. Muller, *Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects*. Immunol Cell Biol, 2001. **79**(6): p. 547-68.
133. Kock, A., et al., *Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light*. J Exp Med, 1990. **172**(6): p. 1609-14.
134. Walsh, L.J., *Ultraviolet B irradiation of skin induces mast cell degranulation and release of tumour necrosis factor-alpha*. Immunol Cell Biol, 1995. **73**(3): p. 226-33.
135. Glaser, R., et al., *The antimicrobial protein psoriasin (S100A7) is upregulated in atopic dermatitis and after experimental skin barrier disruption*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(3): p. 641-9.
136. de Grujil, F.R., *UV-induced immunosuppression in the balance*. Photochem Photobiol, 2008. **84**(1): p. 2-9.
137. Rana, S., et al., *Ultraviolet B suppresses immunity by inhibiting effector and memory T cells*. Am J Pathol, 2008. **172**(4): p. 993-1004.
138. Kelly, D.A., et al., *Sensitivity to sunburn is associated with susceptibility to ultraviolet radiation-induced suppression of cutaneous cell-mediated immunity*. J Exp Med, 2000. **191**(3): p. 561-6.
139. Damian, D.L., R.S. Barnetson, and G.M. Halliday, *Low-dose UVA and UVB have different time courses for suppression of contact hypersensitivity to a recall antigen in humans*. J Invest Dermatol, 1999. **112**(6): p. 939-44.
140. Novakovic, L., et al., *Effects of solar-simulated radiation dose fractionation on CD1a+ Langerhans cells and CD11b+ macrophages in human skin*. Br J Dermatol, 2001. **145**(2): p. 237-44.
141. Dandie, G.W., et al., *Effects of UV on the migration and function of epidermal antigen presenting cells*. Mutat Res, 1998. **422**(1): p. 147-54.
142. Fukunaga, A., et al., *Langerhans cells serve as immunoregulatory cells by activating NKT cells*. J Immunol, 2010. **185**(8): p. 4633-40.
143. Rana, S., L.J. Rogers, and G.M. Halliday, *Systemic low-dose UVB inhibits CD8 T cells and skin inflammation by alternative and novel mechanisms*. Am J Pathol, 2011. **178**(6): p. 2783-91.
144. Hart, P.H., et al., *Dermal mast cells determine susceptibility to ultraviolet B-induced systemic suppression of contact hypersensitivity responses in mice*. J Exp Med, 1998. **187**(12): p. 2045-53.



145. Byrne, S.N., A.Y. Limon-Flores, and S.E. Ullrich, *Mast cell migration from the skin to the draining lymph nodes upon ultraviolet irradiation represents a key step in the induction of immune suppression*. J Immunol, 2008. **180**(7): p. 4648-55.
146. Barr, R.M., et al., *Suppressed alloantigen presentation, increased TNF-alpha, IL-1, IL-1Ra, IL-10, and modulation of TNF-R in UV-irradiated human skin*. J Invest Dermatol, 1999. **112**(5): p. 692-8.
147. Hewison, M., *Vitamin D and the intracrinology of innate immunity*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **321**(2): p. 103-11.
148. Hart, P.H., S. Gorman, and J.J. Finlay-Jones, *Modulation of the immune system by UV radiation: more than just the effects of vitamin D?* Nat Rev Immunol, 2011. **11**(9): p. 584-96.
149. Lefler, D.M., et al., *Identification of proteins in slow continuous ultrafiltrate by reversed-phase chromatography and proteomics*. J Proteome Res, 2004. **3**(6): p. 1254-60.
150. Ullrich, S.E. and S.N. Byrne, *The immunologic revolution: photoimmunology*. J Invest Dermatol, 2012. **132**(3 Pt 2): p. 896-905.
151. Boyman, O., et al., *The pathogenic role of tissue-resident immune cells in psoriasis*. Trends Immunol, 2007. **28**(2): p. 51-7.
152. Zachariae, H., *Prevalence of joint disease in patients with psoriasis: implications for therapy*. Am J Clin Dermatol, 2003. **4**(7): p. 441-7.
153. Mak, R.K., C. Hundhausen, and F.O. Nestle, *Progress in understanding the immunopathogenesis of psoriasis*. Actas Dermosifiliogr, 2009. **100 Suppl 2**: p. 2-13.
154. Henseler, T. and E. Christophers, *Disease concomitance in psoriasis*. J Am Acad Dermatol, 1995. **32**(6): p. 982-6.
155. Neimann, A.L., et al., *Prevalence of cardiovascular risk factors in patients with psoriasis*. J Am Acad Dermatol, 2006. **55**(5): p. 829-35.
156. Sommer, D.M., et al., *Increased prevalence of the metabolic syndrome in patients with moderate to severe psoriasis*. Arch Dermatol Res, 2006. **298**(7): p. 321-8.
157. Gelfand, J.M., et al., *Risk of myocardial infarction in patients with psoriasis*. JAMA, 2006. **296**(14): p. 1735-41.
158. Esposito, M., et al., *An Italian study on psoriasis and depression*. Dermatology, 2006. **212**(2): p. 123-7.
159. Gelfand, J.M., et al., *The risk of mortality in patients with psoriasis: results from a population-based study*. Arch Dermatol, 2007. **143**(12): p. 1493-9.
160. Prinz, J.C., *Disease mimicry--a pathogenetic concept for T cell-mediated autoimmune disorders triggered by molecular mimicry?* Autoimmun Rev, 2004. **3**(1): p. 10-5.
161. Nickoloff, B.J., J.Z. Qin, and F.O. Nestle, *Immunopathogenesis of psoriasis*. Clin Rev Allergy Immunol, 2007. **33**(1-2): p. 45-56.
162. Bowcock, A.M., *Understanding the pathogenesis of psoriasis, psoriatic arthritis, and autoimmunity via a fusion of molecular genetics and immunology*. Immunol Res, 2005. **32**(1-3): p. 45-56.
163. Griffiths, C.E. and J.N. Barker, *Pathogenesis and clinical features of psoriasis*. Lancet, 2007. **370**(9583): p. 263-71.
164. Lowes, M.A., A.M. Bowcock, and J.G. Krueger, *Pathogenesis and therapy of psoriasis*. Nature, 2007. **445**(7130): p. 866-73.
165. Bowcock, A.M. and J.G. Krueger, *Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(9): p. 699-711.
166. Ghoreschi, K., C. Weigert, and M. Rocken, *Immunopathogenesis and role of T cells in psoriasis*. Clin Dermatol, 2007. **25**(6): p. 574-80.
167. Gaspari, A.A., *Innate and adaptive immunity and the pathophysiology of psoriasis*. J Am Acad Dermatol, 2006. **54**(3 Suppl 2): p. S67-80.

168. Sabat, R., et al., *Immunopathogenesis of psoriasis*. Exp Dermatol, 2007. **16**(10): p. 779-98.
169. Nestle, F.O., et al., *Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production*. J Exp Med, 2005. **202**(1): p. 135-43.
170. Lande, R., et al., *Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide*. Nature, 2007. **449**(7162): p. 564-9.
171. Zhou, X., et al., *Novel mechanisms of T-cell and dendritic cell activation revealed by profiling of psoriasis on the 63,100-element oligonucleotide array*. Physiol Genomics, 2003. **13**(1): p. 69-78.
172. Lee, E., et al., *Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris*. J Exp Med, 2004. **199**(1): p. 125-30.
173. Krueger, G.G., et al., *A human interleukin-12/23 monoclonal antibody for the treatment of psoriasis*. N Engl J Med, 2007. **356**(6): p. 580-92.
174. Kauffman, C.L., et al., *A phase I study evaluating the safety, pharmacokinetics, and clinical response of a human IL-12 p40 antibody in subjects with plaque psoriasis*. J Invest Dermatol, 2004. **123**(6): p. 1037-44.
175. Chu, C.C., P. Di Meglio, and F.O. Nestle, *Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases*. Semin Immunol, 2011. **23**(1): p. 28-41.
176. Banno, T., et al., *Unique keratinocyte-specific effects of interferon-gamma that protect skin from viruses, identified using transcriptional profiling*. Antivir Ther, 2003. **8**(6): p. 541-54.
177. Banno, T., A. Gazel, and M. Blumenberg, *Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling*. J Biol Chem, 2004. **279**(31): p. 32633-42.
178. Baum, L.G. and P.R. Crocker, *Glycoimmunology: ignore at your peril!* Immunol Rev, 2009. **230**(1): p. 5-8.
179. Mascanfroni, I.D., et al., *Endogenous lectins shape the function of dendritic cells and tailor adaptive immunity: mechanisms and biomedical applications*. Int Immunopharmacol, 2011. **11**(7): p. 833-41.
180. Rabinovich, G.A., et al., *Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization*. J Immunol, 1998. **160**(10): p. 4831-40.
181. Rabinovich, G.A., et al., *Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices*. Curr Opin Struct Biol, 2007. **17**(5): p. 513-20.
182. Liu, F.T., *Regulatory roles of galectins in the immune response*. Int Arch Allergy Immunol, 2005. **136**(4): p. 385-400.
183. Yang, R.Y., G.A. Rabinovich, and F.T. Liu, *Galectins: structure, function and therapeutic potential*. Expert Rev Mol Med, 2008. **10**: p. e17.
184. Rabinovich, G.A. and M.A. Toscano, *Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(5): p. 338-52.
185. Brewer, C.F., M.C. Miceli, and L.G. Baum, *Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions*. Curr Opin Struct Biol, 2002. **12**(5): p. 616-23.
186. Leffler, H., et al., *Introduction to galectins*. Glycoconj J, 2004. **19**(7-9): p. 433-40.
187. Rabinovich, G.A., et al., *An emerging role for galectins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer*. Scand J Immunol, 2007. **66**(2-3): p. 143-58.
188. Sato, S. and J. Nieminen, *Seeing strangers or announcing "danger": galectin-3 in two models of innate immunity*. Glycoconj J, 2004. **19**(7-9): p. 583-91.



189. Henderson, N.C., et al., *Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(13): p. 5060-5.
190. Lacina, L., et al., *Glycophenotype of psoriatic skin*. Folia Biol (Praha), 2006. **52**(1-2): p. 10-5.
191. Cho, B.K., B.A. Schodin, and D.M. Kranz, *Characterization of a single-chain antibody to the beta-chain of the T cell receptor*. J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25819-26.
192. Vasta, G.R., *Roles of galectins in infection*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(6): p. 424-38.
193. Stowell, S.R., et al., *Human galectin-1, -2, and -4 induce surface exposure of phosphatidylserine in activated human neutrophils but not in activated T cells*. Blood, 2007. **109**(1): p. 219-27.
194. Rabinovich, G.A., et al., *Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation*. Eur J Immunol, 2000. **30**(5): p. 1331-9.
195. La, M., et al., *A novel biological activity for galectin-1: inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions in experimental inflammation*. Am J Pathol, 2003. **163**(4): p. 1505-15.
196. Auvynet, C., et al., *Galectin-1 promotes human neutrophil migration*. Glycobiology, 2013. **23**(1): p. 32-42.
197. Chung, C.D., et al., *Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction*. J Immunol, 2000. **165**(7): p. 3722-9.
198. Rabinovich, G.A., et al., *Specific inhibition of lymphocyte proliferation and induction of apoptosis by CLL-1, a beta-galactoside-binding lectin*. J Biochem, 1997. **122**(2): p. 365-73.
199. Perillo, N.L., et al., *Apoptosis of T cells mediated by galectin-1*. Nature, 1995. **378**(6558): p. 736-9.
200. Rabinovich, G.A., et al., *Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response?* Trends Immunol, 2002. **23**(6): p. 313-20.
201. Illarregui, J.M., et al., *Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10*. Nat Immunol, 2009. **10**(9): p. 981-91.
202. Garin, M.I., et al., *Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells*. Blood, 2007. **109**(5): p. 2058-65.
203. Offner, H., et al., *Recombinant human beta-galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neuroimmunol, 1990. **28**(2): p. 177-84.
204. Rabinovich, G.A., et al., *Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis*. J Exp Med, 1999. **190**(3): p. 385-98.
205. Santucci, L., et al., *Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice*. Hepatology, 2000. **31**(2): p. 399-406.
206. Santucci, L., et al., *Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice*. Gastroenterology, 2003. **124**(5): p. 1381-94.
207. Toscano, M.A., et al., *Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses*. J Immunol, 2006. **176**(10): p. 6323-32.
208. Perone, M.J., et al., *Suppression of autoimmune diabetes by soluble galectin-1*. J Immunol, 2009. **182**(5): p. 2641-53.
209. Shortman, K. and S.H. Naik, *Steady-state and inflammatory dendritic-cell development*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(1): p. 19-30.
210. Toscano, M.A., et al., *Dissecting the pathophysiologic role of endogenous lectins: glycan-binding proteins with cytokine-like activity?* Cytokine Growth Factor Rev, 2007. **18**(1-2): p. 57-71.

211. Ahmad, N., et al., *Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes*. J Biol Chem, 2004. **279**(12): p. 10841-7.
212. Sacchettini, J.C., L.G. Baum, and C.F. Brewer, *Multivalent protein-carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction*. Biochemistry, 2001. **40**(10): p. 3009-15.
213. Larsen, L., et al., *Galectin-3 and the skin*. J Dermatol Sci, 2011. **64**(2): p. 85-91.
214. Liu, F.T., et al., *Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages*. Am J Pathol, 1995. **147**(4): p. 1016-28.
215. Chung, A.W., et al., *Galectin-3 regulates the innate immune response of human monocytes*. J Infect Dis, 2013. **207**(6): p. 947-56.
216. van Stijn, C.M., et al., *Regulation of expression and secretion of galectin-3 in human monocyte-derived dendritic cells*. Mol Immunol, 2009. **46**(16): p. 3292-9.
217. Henderson, N.C. and T. Sethi, *The regulation of inflammation by galectin-3*. Immunol Rev, 2009. **230**(1): p. 160-71.
218. Cortegano, I., et al., *Galectin-3 down-regulates IL-5 gene expression on different cell types*. J Immunol, 1998. **161**(1): p. 385-9.
219. Cortegano, I., et al., *Interaction between galectin-3 and FcgammaRII induces down-regulation of IL-5 gene: implication of the promoter sequence IL-5REIII*. Glycobiology, 2000. **10**(3): p. 237-42.
220. Stillman, B.N., et al., *Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death*. J Immunol, 2006. **176**(2): p. 778-89.
221. Stowell, S.R., et al., *Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion*. J Immunol, 2008. **180**(5): p. 3091-102.
222. Yang, R.Y., D.K. Hsu, and F.T. Liu, *Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(13): p. 6737-42.
223. Hsu, D.K., R.Y. Yang, and F.T. Liu, *Galectins in apoptosis*. Methods Enzymol, 2006. **417**: p. 256-73.
224. Matarrese, P., et al., *Galectin-3 overexpression protects from cell damage and death by influencing mitochondrial homeostasis*. FEBS Lett, 2000. **473**(3): p. 311-5.
225. Jiang, H.R., et al., *Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2009. **182**(2): p. 1167-73.
226. La Porta, C.A. and R. Comolli, *Different levels of TGFbeta, IL-10, IFNgamma and gelatinase A occur in experimental white and black metastases induced by bryostatin 1 or by phorbol ester-treated BL6T murine melanoma cells*. Clin Exp Metastasis, 2000. **18**(5): p. 361-9.
227. Konstantinov, K.N., et al., *Expression of epsilon BP, a beta-galactoside-binding soluble lectin, in normal and neoplastic epidermis*. Exp Dermatol, 1994. **3**(1): p. 9-16.
228. Liu, F.T. and G.A. Rabinovich, *Galectins: regulators of acute and chronic inflammation*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1183**: p. 158-82.
229. Kimata, H., *Enhancement of IgE production in B cells by neutrophils via galectin-3 in IgE-associated atopic eczema/dermatitis syndrome*. Int Arch Allergy Immunol, 2002. **128**(2): p. 168-70.
230. Gazel, A., et al., *Transcriptional profiling defines the effects of nickel in human epidermal keratinocytes*. J Cell Physiol, 2008. **217**(3): p. 686-92.
231. Prieto, V.G., et al., *Galectin-3 expression is associated with tumor progression and pattern of sun exposure in melanoma*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(22): p. 6709-15.
232. Kapucuoglu, N., et al., *Immunohistochemical galectin-3 expression in non-melanoma skin cancers*. Pathol Res Pract, 2009. **205**(2): p. 97-103.

233. Matsumoto, R., et al., *Human ecalectin, a variant of human galectin-9, is a novel eosinophil chemoattractant produced by T lymphocytes*. J Biol Chem, 1998. **273**(27): p. 16976-84.
234. Matsushita, N., et al., *Requirement of divalent galactoside-binding activity of ecalectin/galectin-9 for eosinophil chemoattraction*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8355-60.
235. Matsumoto, R., et al., *Biological activities of ecalectin: a novel eosinophil-activating factor*. J Immunol, 2002. **168**(4): p. 1961-7.
236. Saita, N., et al., *Association of galectin-9 with eosinophil apoptosis*. Int Arch Allergy Immunol, 2002. **128**(1): p. 42-50.
237. Wada, J. and Y.S. Kanwar, *Identification and characterization of galectin-9, a novel beta-galactoside-binding mammalian lectin*. J Biol Chem, 1997. **272**(9): p. 6078-86.
238. Dai, S.Y., et al., *Galectin-9 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells*. J Immunol, 2005. **175**(5): p. 2974-81.
239. Anderson, A.C., et al., *Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells*. Science, 2007. **318**(5853): p. 1141-3.
240. Zhu, C., et al., *The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity*. Nat Immunol, 2005. **6**(12): p. 1245-52.
241. Chou, F.C., S.J. Shieh, and H.K. Sytwu, *Attenuation of Th1 response through galectin-9 and T-cell Ig mucin 3 interaction inhibits autoimmune diabetes in NOD mice*. Eur J Immunol, 2009. **39**(9): p. 2403-11.
242. Seki, M., et al., *Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis*. Clin Immunol, 2008. **127**(1): p. 78-88.
243. Koguchi, K., et al., *Dysregulated T cell expression of TIM3 in multiple sclerosis*. J Exp Med, 2006. **203**(6): p. 1413-8.
244. Niwa, H., et al., *Stable form of galectin-9, a Tim-3 ligand, inhibits contact hypersensitivity and psoriatic reactions: a potent therapeutic tool for Th1- and/or Th17-mediated skin inflammation*. Clin Immunol, 2009. **132**(2): p. 184-94.
245. Sziksz, E., et al., *Galectin-9 in allergic airway inflammation and hyper-responsiveness in mice*. Int Arch Allergy Immunol, 2010. **151**(4): p. 308-17.
246. Wang, F., et al., *Activation of Tim-3-Galectin-9 pathway improves survival of fully allogeneic skin grafts*. Transpl Immunol, 2008. **19**(1): p. 12-9.
247. Oomizu, S., et al., *Galectin-9 suppresses Th17 cell development in an IL-2-dependent but Tim-3-independent manner*. Clin Immunol, 2012. **143**(1): p. 51-8.
248. Dickinson, R.E., et al., *Exome sequencing identifies GATA-2 mutation as the cause of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency*. Blood, 2011. **118**(10): p. 2656-8.
249. Penas, P.F., et al., *Tetraspanins are localized at motility-related structures and involved in normal human keratinocyte wound healing migration*. J Invest Dermatol, 2000. **114**(6): p. 1126-35.
250. Garcia-Lopez, M.A., et al., *Role of tetraspanins CD9 and CD151 in primary melanocyte motility*. J Invest Dermatol, 2005. **125**(5): p. 1001-9.
251. Mittelbrunn, M., et al., *Solar-simulated ultraviolet radiation induces abnormal maturation and defective chemotaxis of dendritic cells*. J Invest Dermatol, 2005. **125**(2): p. 334-42.
252. Burnette, W.N., *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. Anal Biochem, 1981. **112**(2): p. 195-203.



253. Zhang, B., S. Kirov, and J. Snoddy, *WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(Web Server issue): p. W741-8.
254. Rodenhuis, S., et al., *Absence of oncogene amplifications and occasional activation of N-ras in lymphoblastic leukemia of childhood*. Blood, 1986. **67**(6): p. 1698-704.
255. Stern, R.S., *Psoralen and ultraviolet a light therapy for psoriasis*. N Engl J Med, 2007. **357**(7): p. 682-90.
256. Kist, J.M. and A.S. Van Voorhees, *Narrowband ultraviolet B therapy for psoriasis and other skin disorders*. Adv Dermatol, 2005. **21**: p. 235-50.
257. Fujii, S., et al., *Innate Valpha14(+) natural killer T cells mature dendritic cells, leading to strong adaptive immunity*. Immunol Rev, 2007. **220**: p. 183-98.
258. Pack, M., et al., *DEC-205/CD205+ dendritic cells are abundant in the white pulp of the human spleen, including the border region between the red and white pulp*. Immunology, 2008. **123**(3): p. 438-46.
259. Reinhardt, P., et al., *Broad-spectrum sunscreens prevent the secretion of proinflammatory cytokines in human keratinocytes exposed to ultraviolet A and phototoxic lomefloxacin*. Can J Physiol Pharmacol, 2006. **84**(2): p. 221-6.
260. Yoshizumi, M., et al., *Release of cytokines/chemokines and cell death in UVB-irradiated human keratinocytes, HaCaT*. Cell Biol Int, 2008. **32**(11): p. 1405-11.
261. Mizuno, K., H. Okamoto, and T. Horio, *Ultraviolet B radiation suppresses endocytosis, subsequent maturation, and migration activity of langerhans cell-like dendritic cells*. J Invest Dermatol, 2004. **122**(2): p. 300-6.
262. Villablanca, E.J. and J.R. Mora, *A two-step model for Langerhans cell migration to skin-draining LN*. Eur J Immunol, 2008. **38**(11): p. 2975-80.
263. Schwarz, T., *Regulatory T cells induced by ultraviolet radiation*. Int Arch Allergy Immunol, 2005. **137**(3): p. 187-93.
264. Bechetoille, N., et al., *Effects of solar ultraviolet radiation on engineered human skin equivalent containing both Langerhans cells and dermal dendritic cells*. Tissue Eng, 2007. **13**(11): p. 2667-79.
265. Doyen, V., et al., *Thrombospondin 1 is an autocrine negative regulator of human dendritic cell activation*. J Exp Med, 2003. **198**(8): p. 1277-83.
266. Nickoloff, B.J., et al., *Aberrant production of interleukin-8 and thrombospondin-1 by psoriatic keratinocytes mediates angiogenesis*. Am J Pathol, 1994. **144**(4): p. 820-8.
267. Howell, B.G., et al., *Microarray analysis of UVB-regulated genes in keratinocytes: downregulation of angiogenesis inhibitor thrombospondin-1*. J Dermatol Sci, 2004. **34**(3): p. 185-94.
268. Sosinowski, T., et al., *Src-like adaptor protein (SLAP) is a negative regulator of T cell receptor signaling*. J Exp Med, 2000. **191**(3): p. 463-74.
269. Dragone, L.L., et al., *SRC-like adaptor protein regulates B cell development and function*. J Immunol, 2006. **176**(1): p. 335-45.
270. Le Naour, F., et al., *Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics*. J Biol Chem, 2001. **276**(21): p. 17920-31.
271. Tanuma, N., K. Nakamura, and K. Kikuchi, *Distinct promoters control transmembrane and cytosolic protein tyrosine phosphatase epsilon expression during macrophage differentiation*. Eur J Biochem, 1999. **259**(1-2): p. 46-54.
272. Tanuma, N., et al., *Protein tyrosine phosphatase epsilonC selectively inhibits interleukin-6- and interleukin- 10-induced JAK-STAT signaling*. Blood, 2001. **98**(10): p. 3030-4.
273. Bashiardes, S., et al., *SNTG1, the gene encoding gamma1-syntrophin: a candidate gene for idiopathic scoliosis*. Hum Genet, 2004. **115**(1): p. 81-9.

274. Fujita, H., et al., *Lesional dendritic cells in patients with chronic atopic dermatitis and psoriasis exhibit parallel ability to activate T-cell subsets*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **128**(3): p. 574-82 e1-12.
275. Chacon-Salinas, R., et al., *An essential role for platelet-activating factor in activating mast cell migration following ultraviolet irradiation*. J Leukoc Biol, 2013.
276. Silva-Monteiro, E., et al., *Altered expression of galectin-3 induces cortical thymocyte depletion and premature exit of immature thymocytes during Trypanosoma cruzi infection*. Am J Pathol, 2007. **170**(2): p. 546-56.
277. Ellis, C.N. and G.G. Krueger, *Treatment of chronic plaque psoriasis by selective targeting of memory effector T lymphocytes*. N Engl J Med, 2001. **345**(4): p. 248-55.
278. Blaser, C., et al., *Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells*. Eur J Immunol, 1998. **28**(8): p. 2311-9.
279. Norling, L.V., et al., *Inhibitory control of endothelial galectin-1 on in vitro and in vivo lymphocyte trafficking*. FASEB J, 2008. **22**(3): p. 682-90.
280. Fulcher, J.A., et al., *Galectin-1 co-clusters CD43/CD45 on dendritic cells and induces cell activation and migration through Syk and protein kinase C signaling*. J Biol Chem, 2009. **284**(39): p. 26860-70.
281. Cooper, D., L.V. Norling, and M. Perretti, *Novel insights into the inhibitory effects of Galectin-1 on neutrophil recruitment under flow*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(6): p. 1459-66.
282. Demetriou, M., et al., *Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation*. Nature, 2001. **409**(6821): p. 733-9.
283. Fulcher, J.A., et al., *Galectin-1-matured human monocyte-derived dendritic cells have enhanced migration through extracellular matrix*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 216-26.
284. de Koning, H.D., et al., *A comprehensive analysis of pattern recognition receptors in normal and inflamed human epidermis: upregulation of dectin-1 in psoriasis*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(11): p. 2611-20.
285. Cedeno-Laurent, F., et al., *Development of a nascent galectin-1 chimeric molecule for studying the role of leukocyte galectin-1 ligands and immune disease modulation*. J Immunol, 2010. **185**(8): p. 4659-72.
286. Kuo, P.L., et al., *Lung cancer-derived galectin-1 mediates dendritic cell anergy through inhibitor of DNA binding 3/IL-10 signaling pathway*. J Immunol, 2011. **186**(3): p. 1521-30.
287. Camby, I., et al., *Galectin-1: a small protein with major functions*. Glycobiology, 2006. **16**(11): p. 137R-157R.
288. Klima, J., et al., *Differential regulation of galectin expression/reactivity during wound healing in porcine skin and in cultures of epidermal cells with functional impact on migration*. Physiol Res, 2009. **58**(6): p. 873-84.

## 10. CLAVES DE LAS ABREVIATURAS MÁS UTILIZADAS

**CLA:** antígeno leucocitario cutáneo, de su traducción al inglés.

**CPA:** células presentadoras de antígeno (CPA).

**CMH:** complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).

**DCs:** células dendríticas (de su traducción al inglés, dendritic cells).

**dDCs:** células dendríticas dérmicas.

**DE:** desviación estándar.

**EEM:** error estándar de la media.

**gal:** glectina/s.

**IDECs:** células dendríticas dérmicas inflamatorias.

**KCs:** queratinocitos.

**LB:** linfocito/s B.

**LCs:** células de Langerhans (LCs, de su traducción al inglés).

**LPS:** lipopolisacárido.

**LT:** linfocito/s T.

**LTh1:** linfocito/s T-helper tipo 1.

**LTh2:** linfocito/s T-helper tipo 2.

**LTregs:** linfocito/s T regulador/es (LTregs).

**MCs:** melanocitos.

**mDCs:** células dendríticas mieloides.

**moDCs:** células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica.

**PAMS:** péptidos antimicrobianos.

**pDCs:** células dendríticas plasmacitoides.



**pMAPs:** patrones moleculares asociados a patógeno.

**RT-PCR:** reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (de su traducción al inglés).

**RUV:** radiación ultravioleta.

**SEE:** superantígeno de la enterotoxina E estafilocócica.



	<p>INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL EN INMUNODERMATOLOGÍA: DE LAS MOLÉCULAS INMUNORREGULADORAS MODULADAS POR RADIACIÓN ULTRAVIOLETA AL PAPEL DE LAS GALECTINAS EN PACIENTES CON PSORIASIS</p>	
---	---	---

**SlanDCs:** células dendríticas que expresan 6-sulfo N-acetil lactosamina.

**Tip-DCs:** células dendríticas productoras de TNF- $\alpha$  y sintasa inducible del óxido nítrico.

**TLRs:** receptores Toll-like (TLR, de su traducción al inglés).

**UCA:** ácido urocánico.

**WB:** western blot.

## 11. GLOSARIO DE GENES

**AICDA** (Activation-induced cytidine deaminase): Interviene en la inducción de hipermutaciones somáticas (proceso de mutación programada que afecta a las regiones variables de los genes de inmunoglobulina). Típicamente afecta sólo a células inmunitarias individuales y sus mutaciones no se transmiten a la descendencia. Se considera que la expresión de AICDA en vivo está restringida a los centros germinales de los linfocitos B, encontrándose también en varios linfomas de LB. La deaminación de DNA mediada por AICDA es una de las principales causas de mutaciones en los pares de bases G-C en los genes de las inmunoglobulinas durante la hipermutación somática.

**CCR7** (Receptor de quimioquinas CCR7: ligandos CCL19 y CCL21): CCR7 regula mecanismos moleculares quimotácticos responsables de dirigir las DCs hacia los ganglios. Aparte de la quimiotaxis, CCR7 regula en las DCs la velocidad migratoria y la supervivencia de estas células. También se ha descrito que CCR7 participa en la regulación de la endocitosis y la diferenciación en las DCs. El ligando CCL21 se expresa en los vasos linfáticos que conducen a los ganglios y CCL19 y CCL21 se expresan en los propios ganglios linfáticos.

**CD163** (Cluster of Differentiation 163): La proteína codificada por este gen es miembro de la superfamilia “scavenger receptor cysteine-rich” (SRCR) y se expresa exclusivamente en monocitos y macrófagos. Funciona como un receptor que interviene en la fase aguda de la respuesta inmunológica, estando implicado en el aclaramiento y endocitosis de complejos de hemoglobina/haptoglobina por los macrófagos, y de esta manera puede proteger a los tejidos del daño oxidativo mediado por la hemoglobina libre. Esta proteína también puede funcionar como un sensor de bacterias de la inmunidad innata e inductor de inflamación local.

**CXCL2** (Chemokine (C-X-C motif) ligand 2; también denominado *macrophage inflammatory protein 2-alpha* -MIP2-alpha-): pequeña citoquina que pertenece a la familia de las quimioquinas CXC y es secretada por los monocitos y macrófagos, siendo quimiotáctica para los leucocitos polimorfonucleares y las células troncales hematopoyéticas. CXCL2 permite la movilización de las células mediante la interacción con el receptor de quimioquinas localizado en la superficie celular denominado CXCR2.

**CXCR4** (chemokine (C-X-C motif) receptor 4): este gen codifica un receptor de quimioquinas CXC específico para el factor-1 derivado de células estromales. La proteína tiene 7 regiones

transmembrana y se localiza en la superficie celular. CXCR4 actúa con la proteína CD4, permitiendo la entrada en la célula del virus del VIH y también se encuentra altamente expresada en las células del cáncer de mama. Las mutaciones en este gen se han visto asociadas al *síndrome WHIM* (verrugas, hipogammaglobulinemia, infecciones y mielocatexis-neutropenia crónica asociada con hiperplasia medular ósea-).

**ETS2** (V-ets erythroblastosis virus E6 oncogene homolog 2): es una proteína codificada en humanos por el gen *ets2* que pertenece a la familia de los factores de transcripción ETS; estos factores regulan a genes implicados en el desarrollo y la apoptosis. La proteína codificada es también un protooncogén que está implicado en la regulación de la telomerasa.

**FDXR** (Ferrodoxin reductase): Este gen codifica una flavoproteína mitocondrial que inicia el transporte de electrones para que los citocromos P450 los reciban del NADPH. Este paso es necesario para la escisión de la cadena lateral del colesterol en los tejidos esteroideogénicos, la 11-beta hidroxilación de los esteroides en la corteza adrenal, la hidroxilación de la 25-OH-vitamina D3 en el riñón y la hidroxilación del colesterol C-27 en el hígado.

**GADD45A y GADD45B**: Los miembros de la familia de proteínas de GADD45 están involucrados en muchos procesos biológicos clave, tales como el crecimiento y diferenciación celular y la apoptosis. Se han identificado 3 miembros de esta familia en células de mamífero, Gadd45-alpha, Gadd45-beta y Gadd45-gamma y existe cada vez más evidencia sobre el papel de estas proteínas en las funciones de los LT. A diferencia de los otros dos miembros de la familia de Gadd45, Gadd45-alpha se expresa en linfocitos T en reposo. En el contexto del sistema inmunológico se ha descrito como un regulador negativo de la proliferación de LT inducida por activación

**GAL1**: reguladores de la respuesta inflamatoria y la homeostasis de células del sistema inmune. Los miembros de esta familia se han propuesto, en general, como reguladores negativos de la respuesta inmunológica. Centrándonos en el S.I., la galectina-1 se expresa en linfocitos B activados y macrófagos.

**GAL3**: galectina-3 induce apoptosis en LT y neutrófilos y altera la transducción de señales mediadas por el TCR, además se ha descrito su influencia en el balance Th1-Th2 en un modelo de Asma. Está descrito que la expresión de galectina-3 en DCs es clave para el control de la activación de los linfocitos T

**GDF15** (Growth differentiation factor 15; PDF, MIC1, PLAB, NAG-1; PTGFB): Las proteínas morfogenéticas del tejido óseo son miembros de la superfamilia del TGFbeta (factor de crecimiento transformante beta) y regulan la diferenciación y el mantenimiento de los tejidos. Estas proteínas se sintetizan como moléculas precursoras que son procesadas mediante una escisión di-básica para liberar los dominios C-terminales que contienen un dominio de 7 cisteínas conservadas en la proteína madura. EL MIC-1 (macrophage-inhibitory cytokine-1), un miembro de la superfamilia del TGFbeta, se piensa que tiene una importante función en la inflamación mediante la regulación de la actividad de los macrófagos.

**ICOSL** (Inducible T-cell co-stimulator ligand): es un nuevo miembro identificado de la superfamilia B7 que tiene una importante función en la respuesta inmune, esta proteína se manifiesta en la superficie de DCs inmaduras y disminuye después de su activación por TNF-alfa o CD40.

**IFI27** (Interferon, alpha-inducible protein 27; P27; ISG12; FAM14D): proteína inducida por interferón alfa. Se ha descrito como un marcador de proliferación celular en distintas enfermedades inflamatorias de la piel.

**IL-1A** (Interleukin 1, alpha): La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia de la citocina IL-1. Esta citocina está implicada en múltiples respuestas inmunológicas, procesos inflamatorios y en la hematopoyesis. Está producida por monocitos y macrófagos en forma de pro-proteína, que es procesada proteolíticamente y liberada en respuesta al daño celular, produciendo apoptosis. Este gen y otros 8 genes de la familia de la IL1 forman un “cluster” de genes en el cromosoma 2. Se sugiere que el polimorfismo de estos genes se asocia a artritis reumatoide y enfermedad de Alzheimer.

**IL-1B** (Interleukin 1, beta; IL-1, IL1F2): La proteína codificada por este gen es otro miembro de la familia de la citocina IL-1. Esta citocina se produce por macrófagos activados como pro-proteína, que es escindida proteolíticamente a su forma activa por la caspasa 1 (CASP1/ICE). Esta citocina es un importante mediador de la respuesta inflamatoria, y está implicada en una gran variedad de actividades celulares, incluyendo la proliferación celular, diferenciación y apoptosis. La inducción de ciclooxigenasa 2 (PTSG2/COX2) por esta citocina en el sistema nervioso central parece contribuir a la hipersensibilidad al dolor inflamatorio. Como el anterior, también está localizado en el cromosoma 2.

**IL-10** (interleuquina 10 o factor de inhibición de la síntesis de citocinas -CSIF sus siglas en inglés-): es una citocina con propiedades antiinflamatorias capaz de inhibir la síntesis de citocinas proinflamatorias por los linfocitos T y los macrófagos.

**IL-12A** (interleuquina 12A, natural killer cell stimulatory factor 1 o cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35): este gen codifica una subunidad de una citoquina que actúa en linfocitos T y células NK y que tiene un amplio espectro de actividades biológicas. Entre otras, esta citoquina se necesita para la inducción de IFN- $\gamma$  independiente de los LT y es importante también en la diferenciación hacia linfocitos Th1 y Th2. Las respuestas de los linfocitos a esta citoquina están mediados por la proteína activadora de la transcripción STAT4.

**MITF** (Microphthalmia-associated transcription factor): Este gen codifica un factor de transcripción que regula la diferenciación y desarrollo de los melanocitos del epitelio pigmentario de la retina y es responsable también de la transcripción específica de células del pigmento de los genes que regulan la melanogénesis. Mutaciones heterocigotas en este gen causan síndromes auditory-pigmentary, como el síndrome de Waardenburg tipo 2 y el síndrome de Tietz.

**PCNA** (Proliferating cell nuclear antigen): La proteína codificada por este gen se encuentra en el núcleo y es cofactor de la DNA polimerasa delta. La proteína codificada actúa como un homotrímero y ayuda a incrementar el procesamiento de la cadena principal durante la replicación del DNA. En respuesta al daño al DNA, esta proteína es ubiquitinada y está implicada en una de las vías de reparación del DNA.

**PLK2** (polo-like kinase 2, también conocido como SNK, serum inducible kinase): miembro de la “polo” familia de serina/treonina proteín quinasas que cumplen su función en la división normal de la célula.

**POLH** (Polymerase (DNA directed), eta): este gen codifica para una proteína denominada ADN polimerasa eta. Las ADN polimerasas son un grupo de enzimas que “leen” las secuencias de ADN y los usan como plantillas para producir nuevo ADN. Estas enzimas son importantes para copiar o replicar el material genético de cara a la división celular. Las ADN polimerasas también tienen una importancia crítica en la reparación del ADN. La principal función de la ADN polimerasa eta es replicar el ADN que ha sido dañado, particularmente tras la exposición a la RUV. De hecho, este gen está dañado en el xeroderma pigmentoso.

**PTPE** (PTPRE; protein tyrosine phosphatase, receptor type, E; PTPepsilon; RPTepsilon): la proteína codificada por este gen es un miembro de la familia de las proteínas tirosina fosfatasas (PTPs). Éstas se conocen como moléculas de señalización que regulan una gran variedad de procesos celulares. Entre éstos se incluyen el crecimiento celular, la diferenciación, el ciclo mitótico y la transformación oncogénica.

**SLA** (Src-like-adaptor; Slap1; hSLAP): proteína adaptadora, que regula negativamente la señalización del receptor de células T (TCR). El ARNm de SLAP se expresa predominantemente en tejidos linfoides, siendo el timo la localización en la que se encuentran los niveles más elevados.

**SOCS1** (suppressor of cytokine signaling 1): este gen codifica un miembro del *STAT-induced STAT inhibitor (SSI)* que son reguladores negativos de la señalización de citoquinas inducidos por citoquinas. La expresión de este gen puede ser inducida por un subgrupo de citoquinas, incluyendo la IL2, IL3 eritropoyetina, CSF2/GM-CSF e IFN- $\gamma$ . La proteína codificada por este gen funciona en la cascada de los receptores de citoquinas e interviene en un bucle de reentrada negativo que atenúa la señalización de las citoquinas.

**THBS1** (Thrombospondin 1): la proteína codificada por este gen es una subunidad de una proteína homotrimérica unida por puentes disulfuro. Ésta es una glicoproteína adhesiva que media las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. De esta forma, puede unirse a fibrinógeno, fibronectina, laminina, colágeno tipo V e integrinas alfa-V/beta-1. Entre las funciones de esta proteína, encontramos su actividad antiangiogénica mediante su participación en la agregación plaquetaria, angiogénesis y tumorigénesis.



## 12. ANEXOS

### ANEXO 1. PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA EL ESTUDIO DE MOLÉCULAS INMUNORREGULADORAS EN PSORIASIS

El investigador explicará la naturaleza del estudio al paciente y responderá a todas las preguntas que éste tenga en relación al citado estudio. Previamente a cualquier procedimiento realizado al sujeto, el consentimiento informado (CI) por escrito será revisado, firmado y fechado por el paciente y la persona que le explique el citado consentimiento. Una copia del CI se dará al paciente y el original se conservará dentro de su historia clínica. Los CI estarán repartidos por las consultas.

#### Criterios de inclusión:

1. Paciente de mayor de 18 años de edad.
2. Paciente diagnosticado de psoriasis crónica en placas con una duración de la enfermedad de al menos 6 meses desde el diagnóstico.
3. El paciente debe cumplir los siguientes criterios de severidad de psoriasis: PASI mayor a 10 o superficie corporal afecta (BSA) mayor del 10%.
4. El paciente deberá firmar y fechar un consentimiento informado antes de que se lleve a cabo cualquier procedimiento del estudio y estará dispuesto a cumplir con los requerimientos del protocolo de este estudio que, a su vez, deberá ser aprobado por Comité Ético y por Comité Investigador.

#### Criterios de exclusión:

1. Pacientes con diagnóstico de psoriasis eritrodérmica, psoriasis pustulosa localizada o generalizada o psoriasis en gotas.
2. Paciente con historia de inmunosupresión u otros factores asociados a la misma, incluyendo infección por el virus de la inmunodeficiencia humana.
3. Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.
4. Pacientes que hayan sido tratados con corticoides tópicos en las 2 semanas (14 días) previas al inicio del estudio.

5. Pacientes que previamente hayan recibido un tratamiento sistémico (corticoides, metotrexato, ciclosporina, acitretino o fototerapia) dentro de un periodo de lavado de 4 semanas (28 días).
6. Pacientes que hayan sido tratados con un agente biológico (etanercept, infliximab, efalizumab o adalimumab) dentro de un periodo de lavado de 12 semanas (84 días).
7. Pacientes que, por cualquier razón, sean considerados no aptos para ser incluidos en el estudio por el investigador principal.

### **Diseño del estudio.**

Las biopsias de piel y las muestras de sangre se obtendrán el mismo día.

En el momento de la toma de muestras se recopilarán los datos correspondientes a edad, sexo, tiempo de evolución y actividad clínica de la enfermedad (PASI).

### **Obtención de las muestras de piel y sangre.**

Antes de la obtención de muestras el paciente deberá firmar un consentimiento informado por escrito. Las biopsias cutáneas se obtendrán en sacabocados de 8 mm de diámetro de piel psoriásica y piel sana de los pacientes con psoriasis crónica en placas moderada-grave. Las biopsias de la piel no lesional se tomarán de la misma localización anatómica que la de piel psoriásica a una distancia de al menos 5 cm de la placa de psoriasis. Las muestras serán obtenidas preferentemente de zonas no fotoexpuestas.

Las muestras se tomarán en fresco (en gasa humedecida con suero fisiológico).

A continuación, se extraerán 20 ml de sangre venosa periférica (en tubo EDTA de plástico).

Las muestras de piel y sangre periférica de los sujetos sanos, se obtendrán de aquéllos que sean sometidos a cirugía con la piel sobrante de dicha intervención y de las muestras para los análisis sanguíneos preoperatorios respectivamente.

## ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO

### INFORMACIÓN PARA EL CONSENTIMIENTO DEL PACIENTE

**PROYECTO: Psoriasis y moléculas inmunorreguladoras (GADD45, ICOSL, Trombospondina-1 galectinas). Sus implicaciones terapéuticas.**



#### Información y propósito del estudio

El objetivo de este estudio es valorar la función de varias sustancias del organismo en relación con la psoriasis basándonos en datos que apoyan que podrían intervenir en sus mecanismos causales y sin embargo, todavía no han sido lo suficientemente estudiadas. De esta forma, aparte de ayudarnos a una mejor comprensión de las propiedades de estas moléculas, podremos disponer de la posibilidad de encontrar nuevos tratamientos para esta enfermedad.

#### Procedimientos

Si acepto participar en este estudio, como resultado de mi participación se llevará a cabo lo siguiente:

1. Se me requerirá que lea y firme este consentimiento después de responder todas mis preguntas.
2. **Pacientes con psoriasis:** Se tomarán 2 biopsias de piel de 8 mm cada una. Una de ellas de piel con psoriasis y otra de piel sana (en zonas no visibles del cuerpo). La intervención se realizará con anestesia local y siempre después de haber firmado el consentimiento informado de toma de la misma (ver hoja anexa). Asimismo, se extraerán 20 ml de sangre venosa periférica. Soy consciente de que dichas muestras serán empleadas para investigación y no con fines diagnósticos.
3. **Pacientes sanos:** el día en que se realice la intervención quirúrgica, se recogerá el fragmento de piel sobrante para su uso en investigación. **Esto no supone ningún cambio en el procedimiento quirúrgico, por lo que la cirugía será la misma tanto en el caso de otorgar su consentimiento como en el de negarlo.** Por otra parte, de mi estudio analítico preoperatorio, se extraerán 20 ml con fines de investigación.
4. Las muestras se analizarán en el Hospital Universitario de la Princesa.

	<p>INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL EN INMUNODERMATOLOGÍA: DE LAS MOLÉCULAS INMUNORREGULADORAS MODULADAS POR RADIACIÓN ULTRAVIOLETA AL PAPEL DE LAS GALECTINAS EN PACIENTES CON PSORIASIS</p>	
---	---	---

### **Confidencialidad**

Toda la información será confidencial ya que las muestras que se usarán son anónimas (no se dispone de la identidad de ninguno de los pacientes). No obstante, en todo momento se respetará la Ley Orgánica de Protección de Datos 15/1999. Asimismo, esta ley se cumplirá a la hora de la publicación de los resultados del presente estudio. Dado que los datos son confidenciales, estos resultados no serán útiles en el manejo de mi enfermedad y no podré acceder a los mismos. Soy consciente de que tengo derecho a acceder, rectificar o cancelar mis datos, para lo cual, tendré que ponerme en contacto con alguno de los investigadores del proyecto.

### **Participación voluntaria**

La participación en este estudio es voluntaria. Yo tengo el derecho de rehusar participar en el mismo o de interrumpir mi participación en el mismo, en cualquier momento, sin perjuicio de mis cuidados médicos.

### **Criterios de Exclusión del estudio**

Pacientes menores de 18 años serán excluidos del mismo.

### **Financiación**

Este proyecto está financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria pero soy consciente de que no recibiré ninguna remuneración por mi participación.

### **Contacto**

En caso de duda o consulta, no dude en contactar con nosotros:

Dr. Amaro García Díez

Dr. Esteban Daudén Tello

Dra. Silvia Pérez Gala

Dra. Cristina Eguren Michelena

Dra. Diana-Inmaculada Santiago Sánchez-Mateos

**Teléfonos: 915202433/ 915202238**

## CONSENTIMIENTO DEL PACIENTE POR ESCRITO

Yo, (nombre y apellidos)

.....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con .....

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1º Cuando quiera
- 2º Sin tener que dar explicaciones
- 3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha

Firma del paciente

### ANEXO 3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN EN EL ESTUDIO PARA PACIENTES CON DERMATITIS ATÓPICA

1. Paciente mayor de 18 años y menor de 60 años.
2. Cumplir los **Criterios diagnósticos de dermatitis atópica según la UK Working Party (UKWP)**:

Además del **criterio obligatorio (prurito)**, deberán cumplirse **3 ó más criterios** de la siguiente lista:

- Inicio antes de los 2 años de edad (no aplicable a menores de 4 años)
  - Localización en zonas de pliegue (incluidas mejillas en menores de 10 años)
  - Historia de sequedad cutánea en general
  - Historia personal de otra enfermedad atópica (o historia familiar -primer grado- de enfermedad atópica en menores de 4 años)
  - Dermatitis visible en flexuras (o dermatitis en mejilla/frente y parte externa de las articulaciones, en menores de 4 años)
3. No tratamientos sistémicos en el momento de la extracción de sangre periférica
  4. Obtención de la firma del consentimiento informado



#### ANEXO 4. PUBLICACIONES OBTENIDAS EN EL TRANCURSO DE LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS

Los datos obtenidos en esta tesis se publicaron en sendos artículos en revistas de alto impacto científico:

- de la Fuente H, Lamana A, Mittelbrunn M, **Perez-Gala S**, Gonzalez S, García-Diez A, Vega M, Sanchez-Madrid F. Identification of genes responsive to solar simulated UV radiation in human monocyte-derived dendritic cells. PLoS One. 2009 Aug 26;4(8):e6735. **FI 3,73.**
- de la Fuente H, **Perez-Gala S**, Bonay P, Cruz-Adalia A, Cibrian D, Sanchez-Cuellar S, Dauden E, Fresno M, García-Diez A, Sanchez-Madrid F. Psoriasis in humans is associated with down-regulation of galectins in dendritic cells. J Pathol.(2012) 228:193-203. **FI 7,585.**